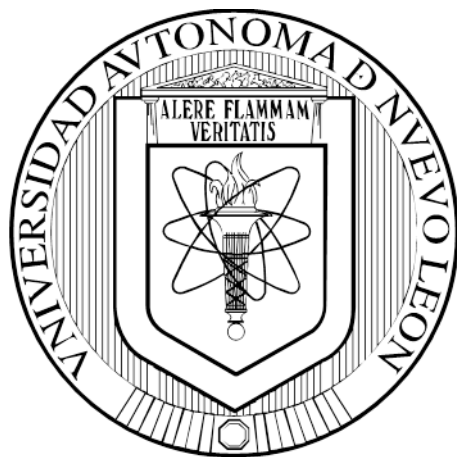


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON  
EL PERFIL METABOLÓMICO DE *Jatropha dioica***

**POR  
Q.F.B. GUADALUPE YAZMÍN SOLÍS CRUZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

**JULIO, 2019**

**CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON EL PERFIL  
METABOLÓMICO DE *Jatropha dioica***

**Aprobación de la Tesis:**



**Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo**

**Directora de Tesis**



**Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez**

**Co-Director de Tesis**



**Dr. C. David Arturo Silva Mares**

**Miembro de la comisión**



**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

**Asesor**



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

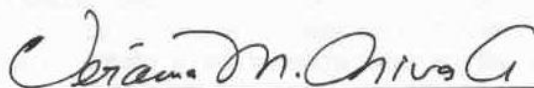
**CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON EL PERFIL  
METABOLÓMICO DE *Jatropha dioica***

**Presentado por:**

**Q.C.F. Guadalupe Yazmín Solís Cruz**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo, la Co-Dirección del Dr. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez como Miembro de la comisión el Dr. David Arturo Silva Mares y como asesor el Dr. Luis Alejandro Pérez López

**Directora**



**Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo**

**Co-Director**



**Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez**

**Miembro de la comisión**



**Dr. C. David Arturo Silva Mares**

**Asesor**



**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

## RESUMEN

Q.C.F Guadalupe Yazmín Solís Cruz

Fecha de graduación: Julio, 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título de estudio:** CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA CON EL PERFIL METABOLÓMICO DE *Jatropha dioica*

**Número de páginas:** 90

**Candidata para el grado de Maestra  
en Ciencias con orientación en  
Química Biomédica**

**Área de estudio:** Química Analítica.

**Propósito y método del estudio:** *Jatropha dioica* es un arbusto que se distribuye principalmente en el centro y norte de México. Su uso en la medicina tradicional mexicana es muy extenso. Existe un especial interés debido a las investigaciones en las que se reportan diversas actividades biológicas, y a los metabolitos secundarios recientemente obtenidos y caracterizados de la raíz de *J. dioica* var. sessiliflora. Sin embargo, se desconocía el vínculo entre las actividades biológicas y, el contenido y proporción de los metabolitos presentes en el perfil cromatográfico. En el presente trabajo se elaboraron extractos de diclorometano de la raíz de *J. dioica* de diversas colectas que comprenden de junio del 2013 a julio del 2018. Se obtuvieron los cromatogramas de cada extracto mediante un método validado de cromatografía de líquidos de alta resolución. La actividad citotóxica ( $CC_{50}$ ) se determinó en la línea celular Vero con el método de Mossman. La evaluación de la actividad anti-herpética (IS) se llevó a cabo mediante el método de reducción de placas virales ( $CI_{50}$ ). La actividad antibacteriana se evaluó por el método de microdilución en caldo contra *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Los resultados de los cromatogramas, así como de las actividades biológicas se importaron a MATLAB® y con ayuda de PLS\_Toolbox® se realizaron los pretratamientos de los cromatogramas, el análisis de los componentes principales y se llevaron a cabo las regresiones de mínimos cuadrados parciales, donde se obtuvieron coeficientes de determinación de 0.52 y 0.59 para la actividad citotóxica y anti-herpética respectivamente.

**Conclusiones y contribuciones:** Se logró determinar que existe una correlación moderada entre la actividad citotóxica ( $CC_{50}$ ) y la actividad anti-herpética (IS) con el perfil metabolómico de *J. dioica*. La proporción de compuestos del perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora varía ligeramente de forma estacional, sin embargo, no presenta variaciones de importancia en su actividad biológica de acuerdo con la época de colecta. El extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* no presentó actividad antibacteriana contra las bacterias evaluadas y por tanto no fue posible establecer una correlación entre el perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora con la actividad antibacteriana.

**FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS**

  
Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo

## **DEDICATORIA**

A mi amor eterno, mi Yeya

A los pilares de mi vida, mis padres

A mi pequeño gigante, mi hermanito

A mi aventurero favorito, mi Yeyo

Al amor de mi vida, David

## AGRADECIMIENTOS

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece (Filipenses 4:13). Primordialmente quiero dar gracias a Dios por acompañarme en cada momento, por hacerme fuerte en medio de la adversidad y por colmar mi vida de bendiciones. Gracias Señor por tu infinito amor.

A mis padres, gracias por apoyarme durante todo este camino, por su amor, consejos, ánimos y regaños. ¡Los amo!

A mi hermanito, gracias por tus palabras de aliento, tus bromas, pero sobre todo gracias por ser mi inspiración, espero hacer las cosas con tanta pasión como lo haces tú.

A mi futuro esposo David, gracias por tu apoyo incondicional, por darme tus fuerzas cuando las mías no alcanzaban, por tu paciencia, por tu amor. No me alcanzarían las palabras para agradecerte por todo y, por tanto, este logro es tan tuyo como mío. Te amo siempre mi amor.

A mi familia, en especial a mis tías Perla Cruz y Paty Cruz, por preocuparse por mí, por cuidar de mi mamá en mi ausencia, por sus ánimos, por las risas. No importa la distancia, siempre estaremos unidas, las amo.

A mis amigos Dulce, Antonio, Imelda y Lily, gracias por sus consejos, oraciones, por tomarse el tiempo de escribirme o llamarme, por sus muestras de cariño, los extraño.

A la Dra. Verónica Rivas, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por confiar en mí sin conocerme, por todo lo que me ha enseñado y por acogerme en su pequeña familia el "Riolo team". Doy gracias a Dios por poner en mi camino a una persona tan bella y con tanta calidad humana.

Al Dr. David Silva, gracias por todo lo que me ha enseñado, por todo su apoyo en el laboratorio, porque a pesar de que le daba mucha lata siempre tenía tiempo para mis dudas, por motivarme a hacer cosas que pensé que no lograría y por las pláticas tan amenas; es difícil encontrar personas con esa perspectiva del universo.

Al Dr. Ricardo Lucio, gracias por toda su ayuda, sus recomendaciones y principalmente por su paciencia, habría perdido la batalla contra la quimiometría sin su apoyo.

Al Dr. Alejandro Pérez, gracias por su apoyo en el laboratorio, sus recomendaciones y las risas.

A mis compañeros de cubículo, gracias por las risas, los juegos, la comida, etc. Estos dos años no hubieran sido lo mismo sin ustedes, gracias por hacer que extrañara mi casa un poco menos. Quiero agradecer especialmente a Omar por siempre darse el tiempo de resolver mis dudas académicas y por escucharme y aconsejarme en cuestiones personales; a Juan, por su apoyo académico y personal, por darme un excelente consejo y compartirme a la mejor jefa del mundo.

A mis compañeros de generación Aída, Mitzi y Jorge, ustedes fueron los primeros en acogerme, gracias por las risas, las comidas, los ánimos, los juegos de turista, sus consejos, regaños, etc. Doy gracias a Dios por su vida amiguitos y por ese tiempo que la han compartido conmigo, ¡los quiero mucho!

A Ivonne por ser tan buena y paciente, por siempre brindarme su ayuda dentro y fuera del laboratorio.

A cada uno de los maestros que participaron en mi formación, gracias por su tiempo y dedicación.

A mi nueva familia los Toscano García, gracias por todo su apoyo, sus ánimos, y sus oraciones. Dios me bendijo con ustedes, ¡los quiero!

A CONACYT por la beca de manutención otorgada durante estos dos años.

Aunque tuviera el don de profecía y descubriera todos los misterios y  
toda la ciencia; y aunque tuviera tanta fe como para trasladar  
montañas, si me falta el amor nada soy (1 Corintios 13:2)

*“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de  
gigantes”*

-Isaac Newton



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1	Género <i>Jatropha</i>	1
1.1.1	Distribución de <i>Jatropha</i> en México	2
1.1.2	Especies de <i>Jatropha</i> con actividades biológicas	4
1.2	Perfil metabólico	5
1.3	Quimiometría	7
1.3.1	Aplicación de pretratamientos	8
1.3.2	Aplicación de modelos de reconocimiento de pautas	11
1.3.3	Aplicación de métodos de regresión	14
1.4	Antecedentes	15
1.4.1	<i>Jatropha dioica</i>	15
1.4.2	Actividades biológicas de <i>Jatropha dioica</i>	16
1.4.3	Compuestos obtenidos de la raíz de <i>Jatropha dioica</i>	17
1.5	Justificación	20
1.6	Objetivo general	21
1.6.1	Objetivos específicos	21
2	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	22
2.1	Material, Equipos y Reactivos	22
2.1.1	Material	22

2.1.2 Equipos	23
2.1.3 Reactivos	24
2.1.4 Material Biológico	25
2.2 Métodos	26
2.2.1 Colecta, tratamiento y almacenamiento de la raíz de <i>Jatropha dioica</i>	26
2.2.2 Optimización del proceso de extracción con diclorometano	27
2.2.3 Obtención del perfil metabolómico del extracto	28
2.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana del extracto	29
2.2.5 Cultivo celular	32
2.2.6 Evaluación de la actividad citotóxica	32
2.2.7 Evaluación de la actividad anti-herpética	33
2.2.8 Evaluación del efecto del cambio de disolvente en la preparación de los extractos para la obtención del perfil metabolómico	35
2.2.9 Búsqueda de la correlación entre las actividades biológicas y los perfiles cromatográficos de <i>J. dioica</i>	35
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1 Resultados de la optimización del proceso de extracción	38
3.2 Obtención del perfil metabolómico del extracto	40
3.3 Resultados de la actividad antibacteriana	42
3.4 Resultados de la actividad citotóxica	43
3.5 Resultados de la actividad anti-herpética	43
3.6 Resultados de la evaluación del efecto del cambio de	45

	disolvente en la preparación de los extractos para la obtención del perfil metabolómico	
3.7	Resultados de la aplicación de pretratamientos	47
3.8	Análisis de componentes principales	49
3.9	Regresión de mínimos cuadrados parciales	56
3.9.1	Correlación del perfil metabolómico de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora con la CC <sub>50</sub>	56
3.9.2	Correlación del perfil metabolómico de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora con la CI <sub>50</sub>	58
3.9.3	Correlación del perfil metabolómico de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora con la actividad anti-herpética	61
3.9.4	Correlación del perfil metabolómico de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora con la actividad antimicrobiana.	63
4	<b>DISCUSIÓN</b>	65
4.1	Obtención del perfil metabolómico	66
4.2	Determinación de la actividad biológica de los extractos	68
4.3	Estudio de la correlación del perfil metabolómico de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora con la actividad biológica	73
5	<b>CONCLUSIONES</b>	83
6	<b>PERSPECTIVAS</b>	84
7	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	85

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Pretratamientos más comunes empleados en quimiometría	10
II	Fechas de colecta de los diferentes lotes de <i>J. dioica</i>	26
III	Factores evaluados en el diseño de experimentos de la extracción	27
IV	Diseño de experimentos de la extracción	27
V	Porcentajes de rendimiento obtenidos en el diseño de experimentos	38
VI	Resultados de CMI de los diferentes lotes contra <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> RO, <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . NA: no presenta actividad a 500 µg/mL	42
VII	Resultados de CC <sub>50</sub> de todos los lotes determinada en células Vero	43
VIII	Resultados de CI <sub>50</sub> de todos los lotes contra VHS-1	44
IX	Resultados de IS de los diferentes lotes	45
X	Proporciones relativas del área bajo la curva de algunos de los compuestos identificados	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del género <i>Jatropha</i> en México	3
2	Ejemplo de un gráfico de los scores de las muestras para dos componentes principales obtenidas por PCA	12
3	Imagen de la planta <i>Jatropha dioica</i>	16
4	Estructuras de los compuestos obtenidos de la raíz de <i>Jatropha dioica</i>	19
5	Perfil cromatográfico del extracto de diclorometano de la raíz de <i>J. dioica</i>	19
6	Valores estadísticos de ajuste	39
7	Gráfico de coeficientes de los factores evaluados	40
8	Cromatograma de la colecta de octubre del 2014	41
9	Cromatogramas sobrepuestos de las réplicas del lote 3	41
10	Comparación de los cromatogramas obtenidos con disolviendo el extracto en DMSO1%+acetonitrilo (línea azul) y disolviendo el extracto en DMSO1%+agua (línea naranja).	46
11	Comparación de los cromatogramas aumentados durante los pretratamientos: (a) suavizado, (b) corrección de línea base y (c) ajuste de los tiempos de retención.	47
12	Comparación de los cromatogramas (a) antes de la aplicación de los pretratamientos, (b) después de la aplicación de los pretratamientos	48
13	Gráfico de los valores de Hotelling frente a los valores residuales.	49

14	Gráfico de scores de las 3 PC'S en tres dimensiones.	50
15	Gráfico de scores de la PC1 frente a la PC2.	51
16	Gráfico de scores de la PC1 frente a la PC3.	51
17	Gráfico de loadings de la primera componente principal, se indican los posibles compuestos a los que corresponden, identificados por sus tiempos de retención	52
18	Comparación de los perfiles metabólicos de la colecta de octubre del 2014 y julio del 2017	53
19	Gráfico de loadings de la segunda componente principal, se indican algunas de las contribuciones más importantes	53
20	Gráfico de loadings de la tercera componente principal, se indican algunas de las contribuciones más importantes	54
21	Cromatogramas de <i>J. dioica</i> var. sessiliflora y <i>J. dioica</i> var. dioica sobrepuestos	55
22	Gráfico de scores de la CC <sub>50</sub>	56
23	Gráfico de loadings de la VL1 de la CC <sub>50</sub>	57
24	Gráfico de loadings de la VL2 de la CC <sub>50</sub>	57
25	Comparación de los perfiles metabólicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la VL2 de la CC <sub>50</sub>	58
26	Gráfico de scores de la CI <sub>50</sub>	59
27	Gráfico de loadings de la VL1 de la CI <sub>50</sub>	60
28	Comparación de los perfiles metabólicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la V1 de la CI <sub>50</sub> .	60
29	Gráfico de scores del IS	61
30	Gráfico de loadings de la VL1 del IS	62

31	Gráfico de loadings de la VL2 del IS	62
32	Comparación de los perfiles metabólicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la VL1 del IS	63
33	Comparación de los perfiles metabólicos de las colectas que exhibieron actividad antibacteriana.	64

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

<b>%</b>	Por ciento
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Mayor que
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrómetros
<b>6-eR</b>	6- <i>epi</i> -riolozatriona
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AD</b>	Análisis discriminante
<b>AMH</b>	Agar Mueller Hinton
<b>C</b>	Citlaltiriona
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentración citotóxica media
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>CLAR</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CMH</b>	Caldo Mueller Hinton
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>cow</b>	Correlation optimized warping
<b>Da</b>	Dalton
<b>dd</b>	Dioica dioica
<b>DMEM</b>	Medio Eagles Modificación de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>ene</b>	Enero
<b>eR</b>	Epoxi-riolozano
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina Humana Normal
<b>IRC</b>	Infrarrojo cercano
<b>IS</b>	Índice de selectividad
<b>Iso-J</b>	Iso-jatrofatrionas
<b>J</b>	Jatrofatriona
<b>jul</b>	Julio
<b>jun</b>	Junio



<b>may</b>	Mayo
<b>mg</b>	miligramos
<b>mg/mL</b>	Miligramos por mililitros
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mL/min</b>	Mililitro por minuto
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MTT</b>	Bromuro metil tiazol tetrazolio
<b>NA</b>	No Activo
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>oct</b>	Octubre
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PC</b>	Componente principal
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PLSR</b>	Regresión de mínimos cuadrados parciales
<b>pR</b>	Peroxi-Riolozano
<b>PRESS</b>	Prediction sum of squares
<b>R</b>	Rioloatriona
<b>R. O</b>	Resistente a oxacilina
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>savgol</b>	Savitzky-Golay
<b>sep</b>	Septiembre
<b>SIMCA</b>	Modelado blando independiente de analogías de clases
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placas
<b>var.</b>	Variedad
<b>VHS-1</b>	Virus del herpes simplex tipo 1
<b>VHS-2</b>	Virus del herpes simplex tipo 2
<b>VL</b>	Variable latente
<b>WLS</b>	Mínimos cuadrados asimétricos ponderados
<b>µg/mL</b>	Microgramo por mililitro

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Género *Jatropha*

El género *Jatropha* pertenece a la tribu *Jonnesiae* de la familia *Euphorbiaceae*, es morfológicamente diverso y se compone por aproximadamente 200 miembros en donde se incluyen especies herbáceas perennes, arbustos, arboles leñosos, suculentas, entre otros [1], [2]. Debido a su gran variedad genética, el género se encuentra distribuido mundialmente desde zonas áridas hasta tropicales. Con el fin de clasificar las especies pertenecientes al género, antiguamente se dividían en dos subgéneros *Curcas* y *Jatropha*. En el primer subgénero se encontraban las especies pertenecientes a México y Centroamérica, además de dos especies en África y una de la india; mientras que el segundo subgénero incluían las especies localizadas en Sudamérica, África y Asia [1], [3].

El género *Jatropha* ha despertado un especial interés debido a su potencial biotecnológico, como lo es la tolerancia a la sequía, alto contenido de aceite en sus semillas y la presencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades medicinales [2]. El nombre *Jatropha* se deriva del griego *jatrós* que significa doctor y de *trophé* que significa comida, debido a las propiedades medicinales que se le atribuyen al género desde la antigüedad [4].

### **1.1.1 Distribución de *Jatropha* en México**

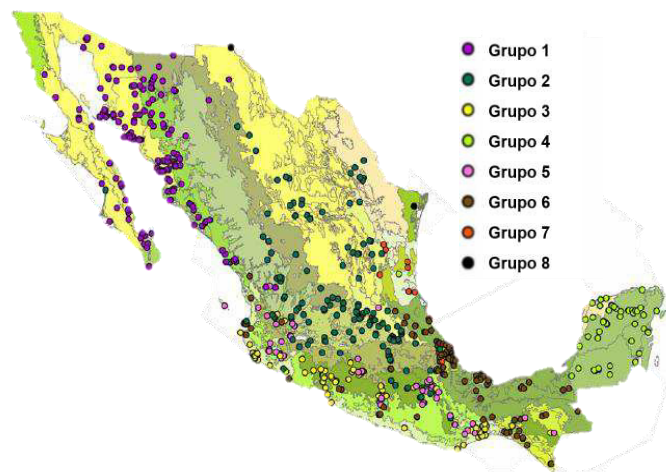
En México están presentes 50 especies del género *Jatropha* de las cuales 39 son endémicas, es decir, que el país contribuye con el 20% de los taxones a nivel mundial. La distribución de las especies de *Jatropha* en México está dada sobre todo por las variables ambientales como la elevación, el tipo de clima, el suelo y la humedad [5], [6].

En el 2013, Fresnedo llevó a cabo un estudio de la distribución del género *Jatropha* en México. En base únicamente en la identidad taxonómica aceptada, se ubicaron en 8 grupos no excluyentes a las diferentes especies presentes en el territorio. Como se puede apreciar en la figura 1, los grupos 1 y 2 se concentran en el norte mientras que el resto se distribuye por el centro y sur del país [5].

La mayoría de las especies de *Jatropha* en México se han domesticado con fines ornamentales, alimenticios, industriales y medicinales. Las especies *J.*

*gossypiifolia* y *J. podagrica* son las más utilizadas como plantas ornamentales. El consumo de semillas de *J. curcas* es común en Veracruz y el norte de Puebla, mientras que las semillas de *J. platyphylla* asadas forman parte de platillos regionales de Sinaloa.

Además, el uso del biodiesel originado a partir de la semilla de *J. curcas* es una excelente alternativa para mitigar la emisión de gases de efecto invernadero [6], [7]. El género *Jatropha* es ampliamente utilizado en la medicina tradicional mexicana, en donde se le atribuyen diversas actividades como antimicrobiana, antiinflamatoria, antifúngica y antiparasitaria; sin embargo, son pocos los estudios en donde se comprueban dichas actividades.



**Figura 1.** Distribución del género *Jatropha* en México

### 1.1.2 Especies de *Jatropha* con actividades biológicas

En la actualidad se han realizado diversas investigaciones con el fin de comprobar las actividades atribuidas a diferentes especies del género, a partir de extractos de diversas partes de las plantas con disolventes de distintas polaridades. Tal es el caso del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha podagrica*, el cual demostró tener actividad anti-proliferativa contra las líneas tumorales A549 y PC12, a concentraciones superiores a 12 µg/mL, además de presentar actividad antioxidante al prevenir la carbonilación de proteínas y la peroxidación de lípidos [8].

En un estudio realizado en ratones, se demostró que el extracto acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* posee un efecto antiofídico contra la mordedura de las serpientes *Bothrops ssp.* El extracto tiene la capacidad de inhibir las actividades enzimáticas del veneno disminuyendo la inflamación y las hemorragias de forma local [9]. El extracto metanólico de *Jatropha neopauciflora* exhibió actividad antibacteriana contra once sepas (cinco gram positivas y cinco gram negativas) y efecto bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*, además el mismo extracto presentó actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*. Dichas actividades son atribuidas a la presencia de múltiples terpenos y sesquiterpenos que tienen la capacidad de inhibir la respiración celular y el transporte de iones, lo que disminuye la permeabilidad de la membrana [10].

Por su parte los extractos acuoso, metanólico y de diclorometano de los tallos de *J. multifida* promovieron la supervivencia de las células MDCK infectadas con el virus de la influenza A H1N1, esto al inhibir la unión del virus a la célula así como la replicación viral, actividades que se le atribuyen a los diversos diterpenos presentes en los extractos [11]. Sin embargo, para obtener mayor información de los metabolitos presentes en los diferentes extractos es necesario construir un perfil metabolómico.

## **1.2 Perfil metabólico**

El análisis exhaustivo de metabolitos de peso molecular inferior a 1500 Da, presentes en matrices biológicas mediante el perfil metabolómico, es la base de la metabolómica. Los análisis metabolómicos se pueden clasificar en dos enfoques, dirigido y no dirigido. En la metabolómica no dirigida se determina todo el conjunto de metabolitos presentes en una matriz biológica dada, mientras que en la metabolómica dirigida los metabolitos seleccionados para el análisis están relacionados o pertenecen a una ruta metabólica específica [12]–[14].

Los metabolitos constituyentes del perfil pueden variar, es decir, aumentar o disminuir su concentración debido a las alteraciones que sufre el organismo cuando está expuesto a diferentes tipos de estrés, como lo son el ataque de patógenos o insectos, las variaciones de temperatura, la sequía, etc.

Esto debido que son precisamente los metabolitos secundarios quienes se encargan de contrarrestar o aminorar el efecto de estos cambios [15].

Los medicamentos herbarios contienen una gran cantidad de compuestos que, aunque pueden estar presentes en concentraciones bajas, son importantes en términos de calidad, seguridad y eficacia. Es posible que existan efectos sinérgicos y sus acciones terapéuticas se basen en la interacción entre numerosos constituyentes. Actualmente el empleo de huellas dactilares para la determinación y cuantificación de la mayor cantidad de marcadores y/o compuestos activos se utiliza para llevar el control de calidad de productos fitoterapéuticos. Esto debido a que:

- Permite autenticar el producto: es posible diferenciar entre especies aun cuando morfológicamente sean casi idénticas.
- Conocer su efectividad: las diferentes proporciones de concentración de constituyentes pueden resultar en diferentes efectos terapéuticos.
- Asegurar su pureza: es posible detectar la presencia de adulteraciones [16]–[18].

La obtención de una huella dactilar que represente de forma fiel la constitución metabólica de un producto herbal depende de varios factores, como el proceso de extracción, los instrumentos de medición, las condiciones de separación, etc.

Las huellas dactilares pueden obtenerse a partir de diferentes métodos analíticos como lo son cromatografía de capa fina (CCF), espectroscopia del

infrarrojo cercano (IRC), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (EM), etc. La elección del método a utilizar dependerá del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos a identificar [19].

La CLAR es un método popular para el análisis de productos fitoterapéuticos porque es fácil de aprender, de utilizar, no está limitada por la volatilidad o estabilidad de compuestos de la muestra y pueden analizarse compuestos polares, no polares e incluso iónicos. Las huellas dactilares cromatográficas permiten autenticar el producto herbal, aún si el número y/o concentración de los constituyentes no es idéntico en diferentes muestras [20], [21].

Los cromatogramas obtenidos a partir de productos herbales contienen una gran cantidad de componentes químicos y muchos de ellos están en baja concentración. Además, pese al riguroso control de las condiciones experimentales, pueden existir cambios en los tiempos de retención y en la línea base de un cromatograma a otro. Como resultado, para obtener huellas digitales cromatográficas confiables, se necesitarían varios tratamientos de datos durante el análisis de huellas dactilares [22].

### **1.3 Quimiometría**

El perfil cromatográfico de un producto herbal, es un conjunto complejo de datos que involucra una gran diversidad de constituyentes y es necesario el



empleo de tratamientos matemáticos y estadísticos para la obtención de información. La asociación internacional de quimiometría, define a la quimiometría como la ciencia de relacionar las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico, con el estado del sistema a través de la aplicación de métodos matemáticos y/o estadísticos, mediante la informática para obtener la máxima información posible [23].

Las técnicas quimiométricas, permiten abordar con mayores posibilidades de éxito, los diferentes problemas que surgen al emplear técnicas cromatográficas o espectroscópicas para la obtención de huellas dactilares, como pueden ser las señales solapadas, la variación de la línea base, la elevada cantidad de señales, etc. Dentro de las herramientas de quimiometría que permiten sobrellevar dichos problemas tenemos, la aplicación de pretratamientos a los datos experimentales, la aplicación de modelos de reconocimiento de pautas y la aplicación de métodos de regresión [24].

### **1.3.1 Aplicación de pretratamientos**

El pretratamiento de datos implica la conversión de los datos originales sin procesar en datos limpios, en los que se eliminaron las variaciones no deseadas, como por ejemplo las desviaciones de la línea base en mediciones espectroscópicas o los cambios en los tiempos de retención de los diferentes constituyentes. La aplicación de pretratamientos tiene como principal objetivo mejorar la calidad de la señal analítica para que sea apta para su utilización en

análisis posteriores. Como tal, el pretratamiento de datos se ubica justo después de la recolección de datos, antes de construir un modelo matemático o antes de aplicar otra forma de analizar los datos [25], [26].

En la actualidad, existe un gran número de métodos de pretratamientos diferentes para mejorar la calidad de las señales analíticas y recabar la mayor información posible. En un pretratamiento de datos a menudo se aplica más de un algoritmo con la finalidad de corregir diferentes defectos en las señales [26]. En la TABLA 1 se presenta una lista con los pretratamientos más comunes, así como una breve descripción de cada uno de ellos.

**TABLA I.** Pretratamientos más comunes empleados en quimiometría

<b>Pretratamiento</b>	<b>Descripción</b>
<b>Normalización</b>	La normalización elimina las variaciones de confusión atribuidas a las fuentes experimentales, como el ruido analítico o el sesgo experimental, y conserva las variaciones relevantes atribuidas a la señal [23].
<b>Alineación</b>	La alineación de las características detectadas en diferentes muestras tiene como objetivo eliminar los cambios entre las muestras para una señal dada para garantizar su posición a lo largo del eje x [25].
<b>Derivadas</b>	El uso de derivadas permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La primera derivada minimiza diferencias de desplazamiento de la línea base y la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda [24].
<b>Centrado</b>	Consiste en restar a cada valor de cada variable el valor medio de la misma, así el valor de cada variable se encontrará referido al centro del modelo [27] .
<b>Filtrado del ruido</b>	El filtrado del ruido está diseñado para separar las señales de los componentes del ruido de fondo que se origina en la matriz química o la interferencia instrumental. Elimina el ruido de la medición y las distorsiones de la línea base [25].
<b>Corrección de línea base</b>	La corrección de línea base es comúnmente empleada en aplicaciones donde la señal de algunas variables es debida solamente a la señal de fondo. Estas variables sirven como referencia para determinar cuanta señal de fondo debe ser eliminada de las variables cercanas para corregir tendencias en la línea base [24], [28].

### 1.3.2 Aplicación de modelos de reconocimiento de pautas

El reconocimiento de pautas implica principalmente la agrupación para asignar señales en clases o categorías en función de su similitud. Dentro de los más utilizados se encuentran el análisis de componentes principales (PCA), el modelado blando independiente de analogías de clases (SIMCA), el análisis discriminante (AD) [29].

#### ❖ Análisis de componentes principales

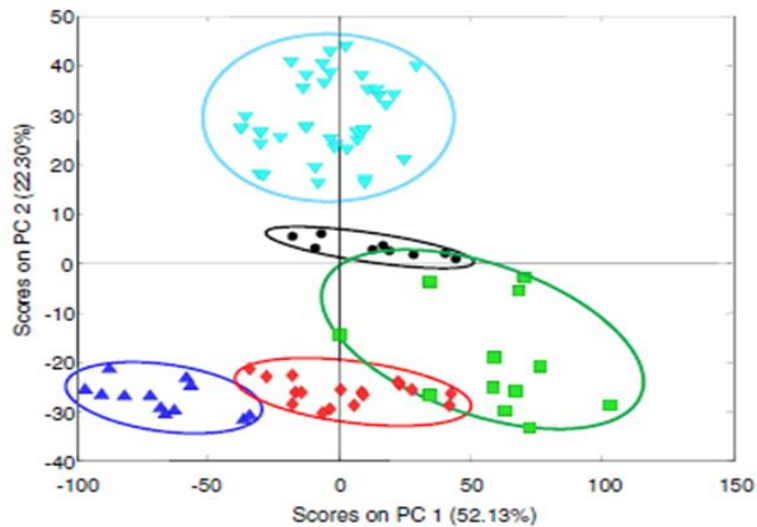
El análisis de componentes principales es un modelo de reconocimiento de pautas no supervisado. Tiene como propósito conservar la mayor parte de la variación que está presente en un conjunto de datos, al reducir las dimensiones de un gran número de variables interconectadas, a unos pocos componentes principales (PCs) que no están correlacionados entre sí. No todos los PCs contienen la misma información, los primeros presentan una mayor variación y se asocian con la información más relevante, mientras que el resto se asocia a variaciones debidas al ruido o al error experimental y pueden ser descartados, con lo que se consigue una importante reducción del número de variables sin perder la información más significativa. Se aplica la siguiente ecuación:

$$X = \sum_{i=a} t_i P_i^T + E$$

donde  $X$  es la matriz de datos a tratar (en esta tesis serán los datos cromatográficos después de su pretratamiento),  $a$  es el número de

componentes principales que contienen la información deseada,  $t_i$  son los scores (datos) para cada componente principal y  $P_i$  los loadings (variables) y  $E$  es una matriz de error, es decir la variación residual de  $X$  que no es explicada por el modelo con  $a$  componentes principales. El superíndice  $T$  indica la matriz traspuesta [24].

En los gráficos de componentes principales es posible observar la correlación entre las diferentes variables e identificar patrones de muestras, agrupamientos, semejanzas y diferencias (Figura 2). Por ejemplo en los gráficos de doble dimensión aquellas que sean muy cercanas serán similares y por ende las más alejadas serán diferentes [30].



**Figura 2.** Ejemplo de un gráfico de los scores de las muestras para dos componentes principales obtenidas por PCA

### ❖ **Modelado blando independiente de analogías de clases**

El modelado blando independiente de analogías de clase es un modelo de reconocimiento de pautas supervisado y está basado en el principio de analogía entre las muestras que pertenecen a una misma clase. El método SIMCA calcula un modelo PCA para cada clase o categoría presente en el objeto de estudio y posteriormente, integra cada una de las clases y calcula sus límites o fronteras con un nivel de confianza seleccionado. Así para conocer si una muestra concuerda con una clase, la información que se calcula es dividida en dos, una parte se explica por el modelo de clase y la otra por los residuales de la muestra. Si estos últimos son significativamente mayores que los de la clase, se concluye que la muestra no pertenece a dicha clase [24], [29].

### ❖ **Análisis discriminante**

El análisis discriminante (AD) es un modelo de reconocimiento de pautas no supervisado, que se utiliza para discriminar dos o más observaciones mediante el uso de un conjunto de variables independientes, con el fin de encontrar la combinación lineal de variables entre observaciones. Para construir un modelo de clasificación, el AD calcula una puntuación de corte (centroide) para cada observación, que puede expresarse como una combinación lineal de variables independientes. Las muestras se clasificarán en uno de los dos grupos de observación según el valor de su puntaje de corte. Así, las muestras se clasifican en los distintos grupos según su distancia al centroide [31].

### 1.3.3 Aplicación de métodos de regresión

El análisis de regresión es una técnica estadística útil para inferir la relación entre una variable dependiente “Y” y variables independientes “X”. La variable dependiente es conocida como variable de respuesta o resultado mientras que las independientes se conocen como predictores, variables explicativas o covariables. Este tipo de análisis estadístico se aplica para buscar alguna relación entre las señales analíticas y alguna propiedad o actividad en la muestra. El método de regresión más empleado en la búsqueda de compuestos activos en productos herbales es la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) [32], [33].

En la regresión de mínimos cuadrados parciales, se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes “X” y las variables dependientes “Y”. El algoritmo PLSR encuentra factores llamados componentes latentes o componentes PLS que conserven la mayor parte de la variación de las variables “X” y que además son las mejores para explicar la respuesta “Y”, es decir, capturar varianza y conseguir correlación [24], [28], [33].

Entonces, “X” y “Y” se descomponen simultáneamente en un producto de otras dos matrices de scores y loadings; como es descrito por las siguientes ecuaciones:

$$X = TP^T + E$$

$$Y = UQ^T + F$$

donde  $TP^T$  se aproxima a los datos de la matriz  $X$  y  $UQ^T$  a los verdaderos valores de  $Y$ . La descomposición no es independiente y existe una relación lineal entre los scores  $T$  y  $U$ . Los términos  $E$  y  $F$  son matrices de error y el superíndice  $T$  significa la transpuesta de la matriz [24].

## **1.4 Antecedentes**

### **1.4.1 *Jatropha dioica***

*Jatropha dioica* es un arbusto nativo de México con un tamaño promedio de 70 cm, sus ramas son de color rojizo y poseen un látex amarillo que al oxidarse se torna rojo, de ahí el nombre popular de sangre de drago (Figura 3). Tiene una distribución bien definida, encontrándose en el centro y norte del país en climas secos y semisecos desde el norte de Querétaro hasta Chihuahua dentro del país, y en el estado de Texas en Estados Unidos de América [34], [35].





**Figura 3.** Imagen de la planta *Jatropha dioica*

Los usos medicinales de este arbusto en la medicina tradicional mexicana son muy diversos: los tallos y raíz cocidos se utilizan para evitar la caída del cabello, para aliviar infecciones por golpes o heridas, para aliviar los ojos irritados, etc., mientras que la raíz cruda se emplea como astringente [36], [37].

#### **1.4.2 Actividades biológicas de *Jatropha dioica***

En 1980 Domínguez X.A y cols., encontraron que el extracto de éter de petróleo de *Jatropha dioica* posee actividad contra *Staphylococcus aureus*, aunque no se reportó un valor de actividad [38]; Posteriormente Villarreal y cols. determinaron que el extracto metanólico del tallo de *J. dioica* presentaba una CMI 0.6 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y una CMI de 0.8 mg/mL contra

*Streptococcus spp* [39]. Por su parte Silva-Belmares y cols., reportaron que el extracto hexánico de la raíz posee actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Staphylococcus aureus* [40]. Mientras que Alanís y cols., reportaron que el extracto hidro-alcohólico de la raíz presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans* con una CMI de 500 µg/mL [41].

Además de las actividades antimicrobianas reportadas de *Jatropha dioica*, en el 2014, Silva Mares y cols. observaron que el extracto hidroalcohólico de la raíz posee actividad anti-herpética moderada contra el virus del herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1 y 2) con una  $CI_{50}$  de 280 µg/mL y 370 µg/mL respectivamente, mientras que la actividad citotóxica contra células Vero fue de  $CC_{50}$ = 644 µg/mL. Luego de realizar un aislamiento biodirigido, se identificó a uno de los componentes responsables de dicha actividad, este compuesto resultó ser la riolozatriona, un compuesto de tipo diterpenoide aislado por primera vez en 1980 por Domínguez y cols. [38], [42].

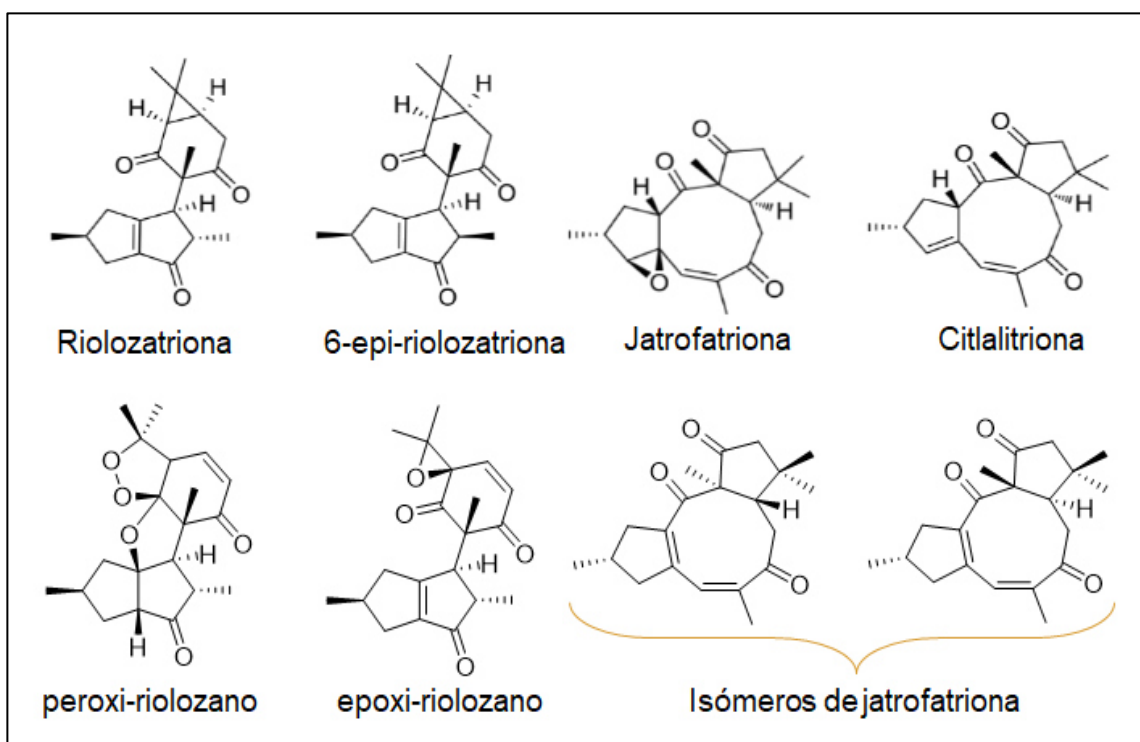
#### **1.4.3 Compuestos obtenidos de la raíz de *Jatropha dioica***

El primer compuesto identificado en *Jatropha dioica* fue la riolozatriona, un metabolito de tipo diterpenoide aislado del extracto de éter de petróleo de la raíz de *J. dioica* [38]. Posteriormente, se aisló del extracto metanólico de la raíz de *J. dioica* otro diterpenoide al cual denominaron citlalitriona [43]

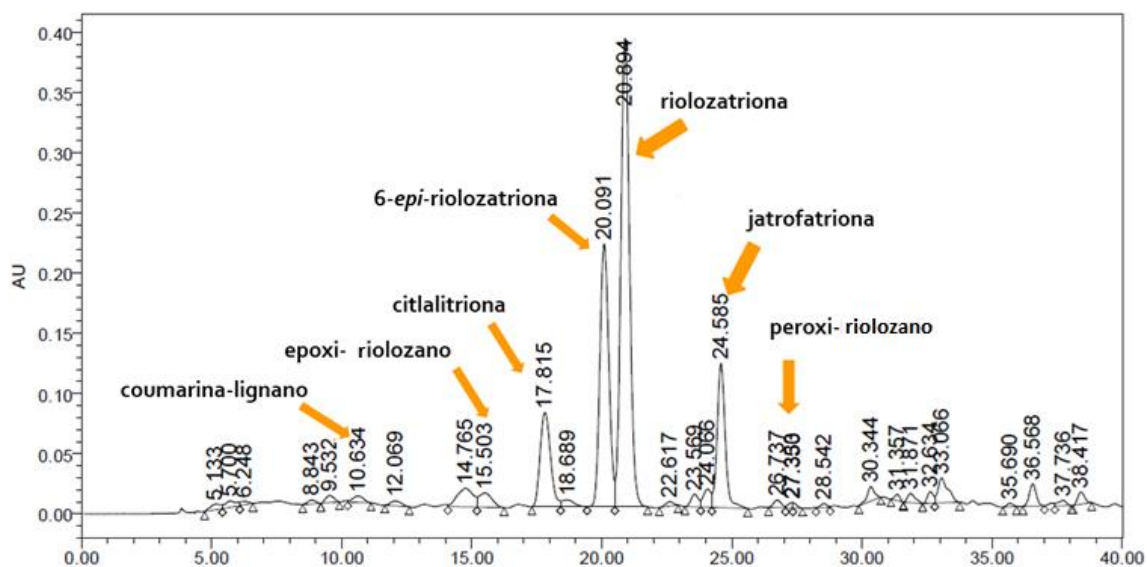
En el 2017 Melchor Martínez y cols., identificaron en el extracto de diclorometano de la raíz de *Jatropha dioica*, un nuevo compuesto de esqueleto de tipo riolozano al cual denominaron 6-*epi*-riolozatriona. En este mismo trabajo, Melchor Martínez reportó a la jatrofatriona y a la citlaltatriona, compuestos ya reportados para otras especies de *Jatropha*. Además, como parte de su tesis doctoral Melchor identificó otros tres compuestos: el denominado peroxi-riolozano y una mezcla de isómeros de jatrofatriona [44], [45].

De manera simultánea, Tamez Fernández encontró dos nuevos compuestos en la raíz de *J. dioica*, un compuesto de tipo cumarina lignano y otro compuesto al cual denominó epoxi-riolozano. Posteriormente en nuestro grupo de trabajo, Loa Martínez en su tesis de licenciatura realizó la caracterización completa del peroxi-riolozano, el epoxi-riolozano y de los isómeros de jatrofatriona y se logró determinar su configuración absoluta. En la figura 4, se muestran las estructuras de los compuestos caracterizados de *J. dioica* [46], [47].

Con el objetivo de analizar los dos compuestos de esqueleto tipo riolozano y los otros compuestos minoritarios, nuestro grupo de trabajo desarrolló un método cromatográfico, mismo que se validó. Además, ya fueron asignadas las señales correspondientes a cada uno de los compuestos identificados, lo que permite emplearlo como perfil metabolómico (Figura 5.)



**Figura 4.** Estructuras de los compuestos obtenidos de la raíz de *Jatropha dioica*



**Figura 5.** Perfil cromatográfico del extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica*

## 1.5 Justificación

El género *Jatropha* es conocido por su uso en la medicina tradicional para curar diversas afecciones. Si bien existen reportes sobre las actividades biológicas de diferentes especies de *Jatropha*, son pocos los estudios en los que se relacionan dichas actividades con los metabolitos producidos.

La especie *Jatropha dioica* es de especial interés debido a su uso etnofarmacológico, a las diversas actividades biológicas reportadas y a los metabolitos secundarios recientemente obtenidos y caracterizados. Sin embargo, se desconoce el vínculo entre las actividades biológicas y, el contenido y proporción de los metabolitos presentes en el perfil cromatográfico. Debido a lo anterior, en este trabajo se pretende determinar si existe relación entre el perfil metabolómico obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución y las actividades antibacteriana, citotóxica y anti-herpética de la raíz de *Jatropha dioica*, mediante el empleo de métodos quimiométricos.

## **1.6 Objetivo general**

Determinar si existe correlación entre las actividades biológicas y el perfil metabolómico del extracto de cloruro de metileno de la raíz de *Jatropha dioica*.

## **1.7 Objetivos específicos**

1. Obtener los extractos de cloruro de metileno y el perfil metabolómico por CLAR de diversas colectas de raíces de *Jatropha dioica*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana, citotóxica y anti-herpética de cada extracto obtenido.
3. Establecer la correlación entre la actividad biológica de *Jatropha dioica* con su perfil metabolómico mediante el uso de la estadística multivariable.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material, Equipos y Reactivos**

##### **2.1.1 Material**

- Botellas de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 mL con tapón de rosca
- Caja de cultivo celular con ventilación de 175 cm<sup>2</sup>
- Cajas de cultivo de 90 mm X 15 mm estériles
- Cámara de Neubauer
- Columna cromatográfica AccQ-Tag (3.9 x 150 mm, 4 µm; Waters)
- Espátulas para polvos
- Filtros para CLAR de 0.45 µm de 13 mm de membrana PTFE
- Filtros Whatman® 40
- Gradilla para 60 tubos
- Insertos de vidrio de 150 µL
- Jeringa de plástico desechable 3 mL

- Matraces bola de 50 y 250 mL con esmeril 24/40
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapa
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Microplacas estériles de poliestireno de 24 y 96 pozos de fondo plano
- Pipetas automáticas de 10, 20, 200 y 1000  $\mu$ L
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas desechables 1, 2, 5 y 10 mL
- Probeta de 25 50, 100, y 250 mL
- Puntillas para pipetas automáticas de volumen ajustable p200 y p1000
- Tamiz con malla de acero de 1 mm, Retsch®
- Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- Tubos cónicos estériles 15 y 50 mL
- Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
- Tubos de fondo plano de 3 mL con tapón de rosca
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Vasos de precipitados de 250 mL

### **2.1.2 Equipo**

- Agitador vórtex Scientific Industries®, modelo SI-A536
- Balanza analítica OHAUS Pioneer®, modelo PA214C
- Balanza granataria OHAUS Pioneer®, modelo PA3102
- Baño de ultrasonido Bromson®, modelo 2510R-DTH
- Bomba de vacío Vacubrand®, modelo IC
- Campana de bioseguridad PRENDO®, modelo CSB-120



- Campana de extracción Lumistell<sup>®</sup>, modelo CEE-120
- Campana de seguridad biológica Esco<sup>®</sup>, modelo LR2-6S2
- Centrifuga Thermo IEC<sup>®</sup>, modelo Centra CL3
- Congelador Thermo Scientific<sup>®</sup>
- Cromatógrafo de líquidos analítico Alliance 2695 con DAD Waters<sup>®</sup>
- Equipo de rotaevaporación Heidolph<sup>®</sup>, modelo 517-61000-01-0
- Esterilizador de material Market Forge<sup>®</sup>, modelo Sterilmatic
- Incubadora Quincy Lab<sup>®</sup>, modelo 10140
- Lector de microplacas Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo 357
- Licuadora de 7 velocidades MAN<sup>®</sup>, modelo LMU-9090
- Microscopio invertido OLYMPUS CORPORATION, modelo CKX41SF
- Refrigerador Daewoo<sup>®</sup>, modelo DFR-2112NRU

### **2.1.3 Reactivos**

- Acetonitrilo grado CLAR J.T Baker<sup>®</sup>
- Aciclovir 400 mg, Laboratorios PISA<sup>®</sup>
- Agar Mueller Hinton (AMH) BD<sup>®</sup>
- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey<sup>®</sup>
- Antibiótico Glucosado Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Azul tripano Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Bromuro metil tiazol tetrazolio (MTT) Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Buffer Fosfato Salino (PBS) Sigma Aldrich<sup>®</sup>
- Caldo Mueller Hinton (CMH) BD<sup>®</sup>

- Cloruro de metileno grado CLAR J.T Baker®
- Colorante de Giemsa CTR®
- Dimetil sulfóxido (DMSO) Fermont®
- Doxorubicina Sigma Aldrich®
- Inmunoglobulina Humana Normal (IgG) Flebogamma®
- Medio Eagles Modificación De Dulbecco (DMEM) Gibco®
- Metanol grado analítico Fermont®
- Metanol grado CLAR J.T Baker®
- Nitrógeno gaseoso 99% de pureza Praxair®
- Oxacilina BioChemiks®
- Solución de Glucosa 5% Laboratorios Pisa®
- Tripsina Gibco®
- Vancomicina 500 mg Laboratorios PISA®

#### 2.1.4 Material Biológico

- Células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaues* (Vero)
- Aislado clínico de VHS-1
- Raíz de la planta *Jatropha dioica* var. sessiliflora
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (R.O)
- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Colecta, tratamiento y almacenamiento de la raíz de *J. dioica*

La colecta de la raíz de *J. dioica* var. sessiliflora se llevó a cabo de junio del 2012 a julio del 2018 en el municipio de Villaldama Nuevo León. En la TABLA II se muestran las fechas de colecta de cada lote. Una vez realizada la colecta, la raíz se lavó con abundante agua y jabón y se enjuagó muy bien para eliminar los restos de detergente. La raíz limpia se secó a temperatura ambiente y se desmenuzó en finos trozos para posteriormente molerla en licuadora. La raíz molida se guardó en recipientes herméticos y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

**TABLA II.** Fechas de colecta de los diferentes lotes

Lote	Año	Mes
1	2012	Junio
2	2014	Mayo
3	2014	Octubre
4	2015	Junio
5	2016	Septiembre
6	2016	Enero
7	2016	Junio
8	2016	Julio
9	2017	Junio
10	2017	Julio
11	2018	Junio
12	2018	Julio

Como adicional se incluyó un lote de raíz de *J. dioica* var *dioica* colectada en el estado de Hidalgo en mayo del 2018.

### 2.2.2 Optimización del proceso de extracción con diclorometano

Se aplicó un diseño factorial completo  $2^3$  aleatorizado con 3 puntos centrales. Los factores evaluados fueron el tamaño de partícula, el tiempo y la velocidad de extracción, estos se evaluaron a dos niveles: alto (+) y bajo (-) como se muestra en la TABLA III, sumando un total de 11 experimentos (TABLA IV).

**TABLA III.** Factores evaluados en el diseño de experimentos de la extracción

Factor	Unidades	Valor alto (+)	Valor bajo (-)
Tamaño de partícula	mm	>1	<1
Velocidad de agitación	rpm	250	150
Tiempo de agitación	min	15	5

**TABLA IV.** Diseño de experimentos de la extracción

Experimento No.	Tiempo de agitación	Velocidad de agitación	Tamaño de partícula
1	15 min	150 rpm	<1 mm
2	45 min	150 rpm	<1 mm
3	15 min	250 rpm	<1 mm
4	45 min	250 rpm	<1 mm
5	15 min	150 rpm	>1 mm
6	45 min	150 rpm	>1 mm
7	15 min	250 rpm	>1 mm
8	45 min	250 rpm	>1 mm
9	30 min	200 rpm	<1 mm
10	30 min	200 rpm	<1 mm
11	30 min	200 rpm	<1 mm

En todos los casos se pesaron 5 g de la raíz (en el caso de partículas inferiores a 1 mm se realizó un tamizaje previo) y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con tapa, en donde se vertieron 50 mL de diclorometano. Posteriormente, se llevó el matraz a una placa de agitación variando el tiempo y velocidad de agitación. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Whatman #40 y el filtrado se recabó en un matraz bola de 50 mL. Este proceso se repitió en dos ocasiones más con 30 mL de diclorometano cada una. Todo el filtrado se llevó a sequedad por evaporación del disolvente, a presión reducida y a temperatura de 37 °C. Los extractos obtenidos se pesaron para calcular el porcentaje de recuperación que fue la variable de respuesta para el diseño de experimentos.

Con ayuda del programa estadístico MODDE pro® se construyeron los gráficos de valores de ajuste y de coeficientes. Una vez determinadas las mejores condiciones estas se emplearon para la obtención de los extractos de los diferentes lotes.

### **2.2.3 Obtención del perfil metabolómico del extracto**

El proceso de obtención del perfil metabolómico se llevó a cabo para cada una de las réplicas de los extractos de los 12 lotes de *J. dioica* var *sessiliflora* y el lote adicional de *J. dioica* var *dioica*. Se pesaron 2 mg del extracto y se disolvieron en 20 µL de DMSO y posteriormente en 980 µL de

acetonitrilo. A continuación, la solución se filtró mediante un filtro con membrana de nylon (0.45  $\mu\text{m}$ ), para posteriormente inyectar 5  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo.

La fase móvil fue una solución de agua/metanol la cual se encontró a un flujo de 0.2 mL/min. Se aplicó un gradiente con acetonitrilo iniciando con un 50% en agua, el cual se incrementó de forma lineal hasta llegar a 100% (tomó aproximadamente 35 min) y se mantuvo por 5 minutos antes de regresar a las proporciones iniciales. Todos los disolventes y soluciones que se utilizaron fueron filtrados con membranas de nylon (0.45  $\mu\text{m}$ ) y se sometieron a baño de ultrasonido por 15 minutos para su desgasificación.

La detección de los diferentes metabolitos presentes en los extractos se llevó a cabo mediante un barrido de 210 a 600 nm, mientras que la cuantificación se realizó a 254 nm.

#### **2.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana del extracto**

La evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se realizó por el método de microdilución en placa con caldo Mueller Hinton.

##### **❖ Preparación de los microorganismos**

A partir de un cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* en agar Mueller Hinton de 24-48 h de crecimiento se tomaron de 3 a 4 colonias. Las colonias se depositaron en caldo Mueller

Hinton y se incubaron de 24-37 h. Posteriormente 100  $\mu$ L de suspensión se transfirieron a 3 mL de CMH y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland. Finalmente, se realizó una dilución a una proporción 1: 50 con CMH para obtener la solución de trabajo.

#### ❖ **Preparación de las muestras del extracto de diclorometano**

Se pesaron 2 mg de cada uno de los lotes y se disolvieron en 20  $\mu$ L de DMSO, posteriormente se agregaron 980  $\mu$ L de CMH. Se utilizaron 100  $\mu$ L de cada muestra y se realizó una dilución seriada al doble.

#### ❖ **Preparación de los controles**

El control positivo fue vancomicina, para lo cual se preparó una solución acuosa a una concentración de 256  $\mu$ g/mL. Se utilizaron 100  $\mu$ L del control positivo y se realizó una dilución seriada al doble.

El control de disolvente se preparó tomando 20  $\mu$ L de DMSO y disolviéndolos en 980  $\mu$ L de CMH, la solución se utilizó como muestra y se realizaron diluciones seriadas al doble.

El control negativo o control de crecimiento se preparó depositando 100  $\mu$ L de inóculo bacteriano, más 100  $\mu$ L de CMH en ocho pocillos de la microplaca.

El control del medio de cultivo se preparó depositando 200  $\mu$ L de CMH en cuatro pocillos de la microplaca.

### ❖ **Técnica de microdilución en placa**

El bioensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, a todos los pocillos de la periferia se les agregaron 200  $\mu$ L de agua bidestilada estéril. En los pocillos correspondientes al control del medio de cultivo se les agregaron 200  $\mu$ L de CMH mientras que a los restantes se les agregaron 100  $\mu$ L de CMH. A continuación, se muestran las concentraciones finales que se obtuvieron tanto de los controles positivo, negativo y de disolvente como de la muestra.

- Muestras: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95  $\mu$ g/mL.
- Vancomicina: 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1  $\mu$ g/mL.
- Disolvente: 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 %

Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano a los pocillos de muestras, de control positivo, de control negativo y control de disolvente. La microplaca se incubó a 37°C durante 24 horas.

### ❖ **Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria se determinó utilizando la sal de MTT. Las células metabólicamente activas transformaron el MTT en formazán produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular. Una vez incubada la microplaca se les añadió a los pocillos interiores 10  $\mu$ L de una solución de 5 mg/mL de MTT. La concentración CMI fue la concentración en la que ya no se presentó un cambio en la coloración.



### **2.2.5 Cultivo celular**

Las células Vero se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2% y penicilina al 1% en monocapa hasta que se obtuvo una confluencia 80-90% a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 24 o 96 pozos, estas placas se utilizaron en los bioensayos de reducción de placas virales y citotoxicidad respectivamente.

### **2.2.6 Evaluación de la actividad citotóxica**

#### **❖ Preparación de las muestras del extracto de diclorometano**

Se pesaron 2 mg del extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* de cada lote y se disolvieron con 1 mL de medio de cultivo DMEM al 1% de DMSO para obtener una concentración de 2,000 µg/mL.

#### **❖ Determinación de la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>)**

La determinación de la CC<sub>50</sub> se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos, se sembraron 20,000 células por pozo y se cultivaron con medio DMEM suplementado (suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina al 1%), incubándolas 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se adiciona con diferentes concentraciones del extracto de diclorometano (125, 250, 500 y 1,000 µg/mL) y se llevó a incubación por 72 h. Como control negativo se

emplearon células Vero adicionadas únicamente con el medio DMEM suplementado.

Una vez concluido el periodo de incubación, se determinó la viabilidad celular mediante la adición de 10 µL de una solución de 5 mg/mL de MTT por pozo, se incubaron 3 h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se removió y se añadieron 100 µL de DMSO con el objetivo de disolver los cristales de formazán. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplaca. La CC<sub>50</sub> fue la concentración del extracto que redujo la viabilidad celular en un 50%, para la determinación de la viabilidad celular se utilizó la siguiente formula:

$$\%Viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} (100)$$

DO: Densidad óptica

Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

### **2.2.7 Evaluación de la actividad anti-herpética**

#### **❖ Preparación de las muestras del extracto de diclorometano**

Se pesaron 3 mg del extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* de cada lote y se disolvieron con 3 mL de medio de cultivo DMEM suplementado al 1% de DMSO para obtener una concentración de 1,000 µg/mL.

#### ❖ **Determinación de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)**

La CI<sub>50</sub> se determinó mediante el ensayo de reducción de placas virales. Para llevar a cabo el ensayo se sembraron 120,000 células Vero por pocillo en una placa de 24 pocillos. A continuación, se infectaron con 25 unidades formadoras de placas (UFP) del VHS-1 y se llevaron a incubación por 1 h, a 37 °C en agitación constante. Luego de la incubación, se retiró el sobrenadante y se adicionó medio fresco suplementado con DMSO al 1% y 0.32% de IgG. Posteriormente, se añadieron a los pozos concentraciones de 62.5, 32.125 y 15.625 µg/mL del extracto previamente filtrado y se llevaron a incubación 48 h.

El control positivo consistió en la adición de Aciclovir 0.5 µg/mL, mientras que el control negativo consistió en reemplazar el volumen añadido del extracto por medio de cultivo DMEM suplementado.

Finalmente, las células se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. La CI<sub>50</sub> fue aquella en la que se observó una reducción del 50% de la formación de UFP comparándola contra el 0% de reducción del control negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### ❖ **Determinación del índice de selectividad**

El índice de selectividad del extracto de diclorometano de la raíz de *Jatropha dioica* se determinó mediante la división de la CI<sub>50</sub> entre la CC<sub>50</sub>.

### **2.2.8 Evaluación del efecto del cambio de disolvente en la preparación de los extractos para la obtención del perfil metabolómico.**

El presente procedimiento se diseñó con la finalidad de evaluar el efecto de los diferentes sistemas de disolventes utilizados, tanto en el análisis cromatográfico como en los ensayos biológicos, sobre el perfil metabolómico de la raíz de *J. dioica*. Para ello se pesaron 2 mg de las colectas de octubre del 2014, junio del 2015 y julio del 2018, estas se disolvieron inicialmente en 20  $\mu$ L de DMSO y luego en 980  $\mu$ L de agua. A continuación, las soluciones se filtraron utilizando un filtro con membrana de nylon (0.45  $\mu$ m), para posteriormente inyectar 5  $\mu$ L al cromatógrafo. Se siguieron las mismas condiciones cromatográficas que las indicadas en la sección 2.2.3.

### **2.2.9 Búsqueda de la correlación de las actividades de *J. dioica* con su perfil metabolómico**

#### **❖ Aplicación de pretratamientos**

La información recabada de los cromatogramas de las réplicas de los diferentes extractos en formato ARW, así como los resultados de los bioensayos se exportaron a MATLAB® con el objetivo de agilizar el manejo de los datos. A continuación, en el programa PLS-Toolbox se llevó a cabo el pretratamiento de los datos, se inició con el recorte de los extremos del cromatograma original de 60 min dejando únicamente las señales que comprenden de 5 a 40 min. Se continuó con un suavizado empleando el

método de filtrado de Savitzky-Golay (savgol) y las variaciones en la línea base fueron minimizadas por medio del método de mínimos cuadrados asimétricos ponderados (WLS). Luego se realizó un ajuste de los tiempos de retención mediante la función COW (correlation optimized warping), para terminar con la co-adición de las réplicas de cada lote [28].

#### ❖ **Análisis de componentes principales (PCA)**

El modelo matemático se construyó incluyendo los triplicados de los 13 lotes descritos en la sección 2.2.1. Se inició con una normalización área unidad y un centrado en la media como preprocesamiento. La validación cruzada se realizó con el método de persianas venecianas, con tres muestras por ciego, 5 divisiones de datos y un máximo de 20 PC's. El número óptimo de factores se determinó con el criterio del valor mínimo de PRESS (prediction sum of squares) en la validación cruzada. Los límites para el espacio definido por el modelo ( $T^2$ ) y su espacio residual (Q) se establecieron con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el gráfico de scores para observar el agrupamiento natural de las muestras. Los gráficos de loadings se emplearon para conocer la contribución de las variables que fueron importantes para describir las muestras.

#### ❖ **Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR)**

El modelo matemático se construyó incluyendo únicamente los lotes pertenecientes a *J. dioica* var. sessiliflora. En la construcción del modelo de PLSR, en la matriz "X" se encontraban los perfiles metabolómicos de las

diferentes colectas y se utilizó un vector “Y” para cada una de las actividades biológicas evaluadas. Se inició con una normalización área unidad y un centrado en la media como preprocesamiento para la matriz “X”. La validación cruzada se realizó con el método de persianas venecianas con una muestra por ciego, 5 divisiones de datos y un máximo de 20 PC's. El número óptimo de factores se determinó con el criterio del valor mínimo de PRESS (prediction sum of squares) en la validación cruzada. El estadístico empleado para evaluar el grado de correlación fue el coeficiente de determinación  $r^2$ . El gráfico de scores se utilizó para identificar la distribución de las muestras y los gráficos de loadings se emplearon para conocer la contribución de las variables que fueron importantes para describir la relación entre las señales y las actividades biológicas.

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Resultados de la optimización del proceso de extracción

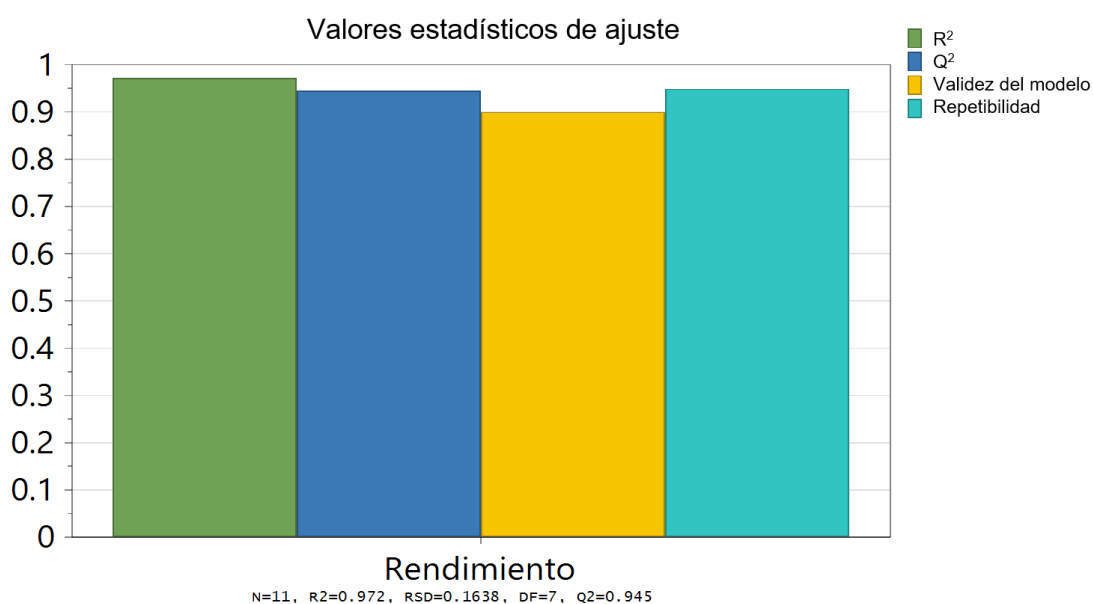
Los porcentajes de recuperación que se obtuvieron en el diseño de experimentos expuesto en el punto 2.2.2, se muestran en la TABLA V.

**TABLA V.** Porcentajes de rendimiento obtenidos en el diseño de experimentos

<b>Tiempo de agitación</b>	<b>Velocidad de agitación</b>	<b>Tamaño de partícula</b>	<b>Rendimiento</b>
15 min	150 rpm	<1 mm	<b>2.93%</b>
45 min	150 rpm	<1 mm	<b>2.84%</b>
15 min	250 rpm	<1 mm	<b>2.79%</b>
45 min	250 rpm	<1 mm	<b>3.03%</b>
15 min	150 rpm	>1 mm	<b>1.22%</b>
45 min	150 rpm	>1 mm	<b>1.34%</b>
15 min	250 rpm	>1 mm	<b>1.09%</b>
45 min	250 rpm	>1 mm	<b>1.23%</b>
30 min	200 rpm	<1 mm	<b>2.47%</b>
30 min	200 rpm	<1 mm	<b>2.81%</b>
30 min	200 rpm	<1 mm	<b>2.76%</b>

Como se puede observar los porcentajes varían del 1.09 al 3.03 % que corresponden a 54.9 mg y 151.5 mg respectivamente. En todos los casos se obtiene la cantidad necesaria del extracto para cumplir con los objetivos (30 mg aproximadamente).

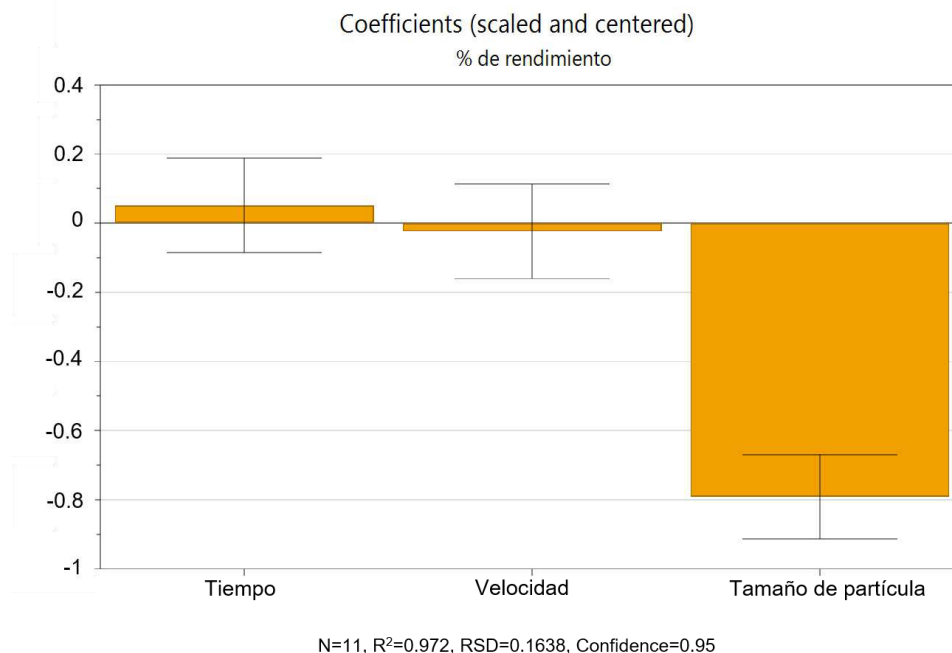
En la figura 6, se muestra el gráfico de valores estadísticos de ajuste al modelo, todos los valores se encuentran por arriba de 0.9.



**Figura 6.** Valores estadísticos de ajuste

Con los resultados de rendimiento del diseño de experimentos se construyó el gráfico de coeficientes que se muestra en la figura 7. Se observa que el tiempo y la velocidad de agitación no tienen una contribución importante para mejorar el rendimiento, en este caso la variable que más contribuye es el tamaño de partícula.





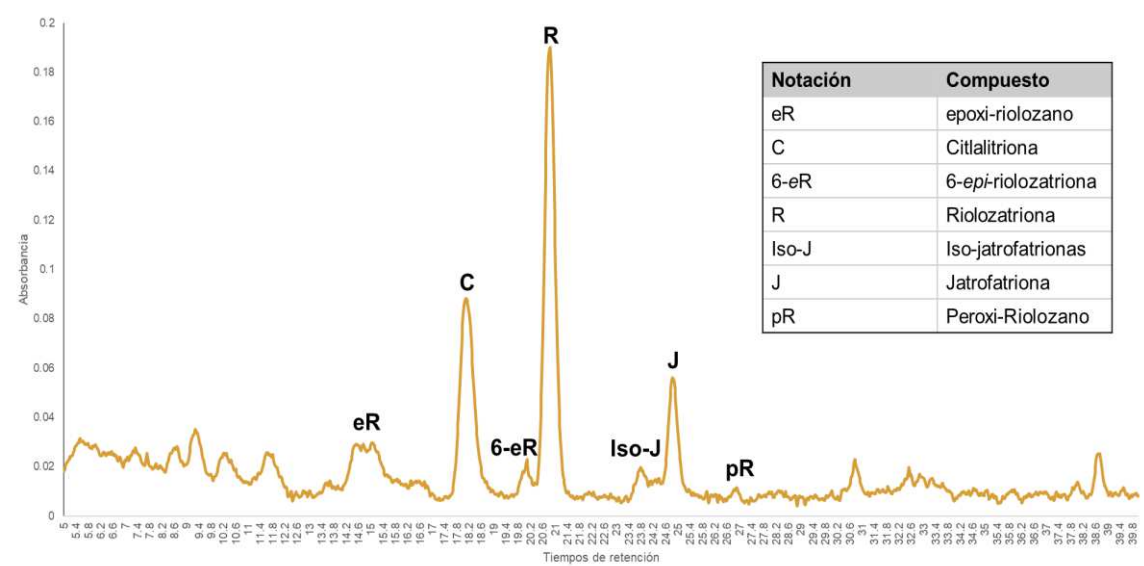
**Figura 7.** Gráfico de coeficientes de los factores evaluados

Tomando en cuenta todo lo anterior se decidió trabajar con el menor tiempo de agitación es decir 15 min, a una velocidad de 200 rpm que es la que normalmente se utiliza en este tipo de procesos y un tamaño de partícula inferior a 1 mm.

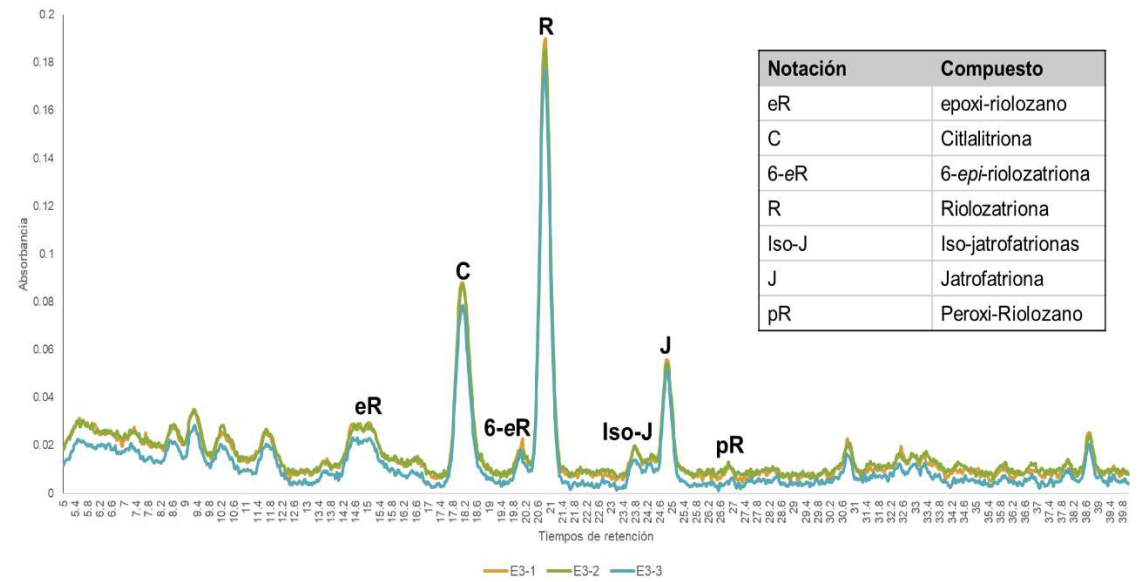
### 3.2 Obtención del perfil metabolómico del extracto

Se obtuvieron un total de 39 cromatogramas con un tiempo de corrida de 60 min. En la figura 8 aparece el cromatograma obtenido a 254 nm correspondiente a la colecta de octubre del 2014 (lote 3), se contabilizan alrededor de 54 picos; se indican las señales de algunos de los compuestos identificados y caracterizados. En la sobreposición de las réplicas de extracción de la colecta de octubre del 2014 (Figura 9), se identifican los mismos

compuestos variando únicamente un poco en la intensidad de las señales. Se compararon las réplicas de las diversas colectas y se observaron los mismos resultados.



**Figura 8.** Cromatograma de la colecta de octubre del 2014



**Figura 9.** Cromatogramas sobrepuestos de las réplicas de extracción del lote 3

### 3.3 Resultados de la actividad antibacteriana

En la TABLA VI se muestran los resultados obtenidos de CMI de cada lote contra las diferentes bacterias, el lote 13 corresponde a la colecta de *J. dioica* var. *dioica* del estado de Hidalgo. Como se puede observar sólo el lote 12 presentó una CMI de 500 µg/mL contra *S. aureus* RO, el resto de los lotes no exhibieron actividad contra la bacteria en las concentraciones probadas. En el caso de *S. aureus* ningún lote presentó actividad contra la bacteria en concentraciones ≤500 µg/mL. Los lotes 9, 10, 11 y 12 presentaron una CMI de 500 µg/mL contra *E. coli*, este comportamiento se repitió para *B. subtilis* exceptuando el lote 9.

**TABLA VI.** Resultados de CMI de los diferentes extractos.

Lote No.	CMI contra <i>S. aureus</i> RO	CMI contra <i>S. aureus</i>	CMI contra <i>E. coli</i>	CMI contra <i>B. subtilis</i>
1	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	500 µg/mL	NA
10	NA	NA	500 µg/mL	500 µg/mL
11	NA	NA	500 µg/mL	500 µg/mL
12	500 µg/mL	NA	500 µg/mL	500 µg/mL
13	NA	NA	NA	NA
NA: no presenta actividad a 500 µg/mL.				

### 3.4 Resultados de la actividad citotóxica

En la TABLA VII se enlistan los resultados de la concentración citotóxica media de cada lote probado en células Vero, el lote 13 corresponde a la colecta de *J. dioica* var. *dioica* del estado de Hidalgo. La CC<sub>50</sub> de los extractos de cloruro de metileno de la raíz de *J. dioica* var. *sessiliflora* se encontró en valores entre 107.18 y 217.24 µg/mL.

**TABLA VII.** Resultados de CC<sub>50</sub> de todos los lotes determinada en células Vero

Lote No.	Colecta	CC <sub>50</sub>	DE
1	jun-13	135.57	± 11.97
2	may-14	138.35	± 5.51
3	oct-14	124.12	± 4.53
4	jun-15	117.21	± 5.33
5	sep-15	107.38	± 9.60
6	ene-16	107.18	± 4.06
7	jun-16	138.62	± 7.98
8	jul-16	161.03	± 13.63
9	jun-17	139.14	± 6.26
10	jul-17	198.98	± 13.12
11	11-jul-18	217.24	± 18.60
12	23-jul-18	163.50	± 3.66
13	mayo-18	111.00	± 4.92

### 3.5 Resultados de la actividad anti-herpética

En la TABLA VIII se muestran los resultados de la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de cada lote contra el virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-

1), el lote 13 corresponde a la colecta de *J. dioica* var. *dioica* del estado de Hidalgo. La  $CI_{50}$  de los extractos de cloruro de metileno de la raíz de *J. dioica* var. *sessiliflora* se encontró en valores entre 20.45 y 43.27  $\mu\text{g/mL}$ .

**TABLA VIII.** Resultados de  $CI_{50}$  de todos los lotes contra VHS-1

Lote No.	Colecta	$CI_{50}$	DE
1	jun-13	20.98	$\pm 1.89$
2	may-14	20.45	$\pm 1.11$
3	oct-14	21.13	$\pm 5.47$
4	jun-15	26.35	$\pm 6.13$
5	sep-15	22.56	$\pm 4.88$
6	ene-16	21.60	$\pm 5.14$
7	jun-16	23.50	$\pm 6.62$
8	jul-16	42.10	$\pm 1.60$
9	jun-17	43.27	$\pm 0.65$
10	jul-17	42.40	$\pm 1.42$
11	11-jul-18	42.68	$\pm 0.15$
12	23-jul-18	40.86	$\pm 7.50$
13	mayo-18	30.34	$\pm 3.69$

La TABLA IX presenta los resultados del índice de selectividad (IS) de cada lote, el lote 13 corresponde a la colecta de *J. dioica* var. *dioica* del estado de Hidalgo. El índice de selectividad de los extractos de cloruro de metileno de la raíz de *J. dioica* var. *sessiliflora* se encontró en valores entre 3.2 y 6.8.

**TABLA IX.** Resultados de IS de los diferentes lotes

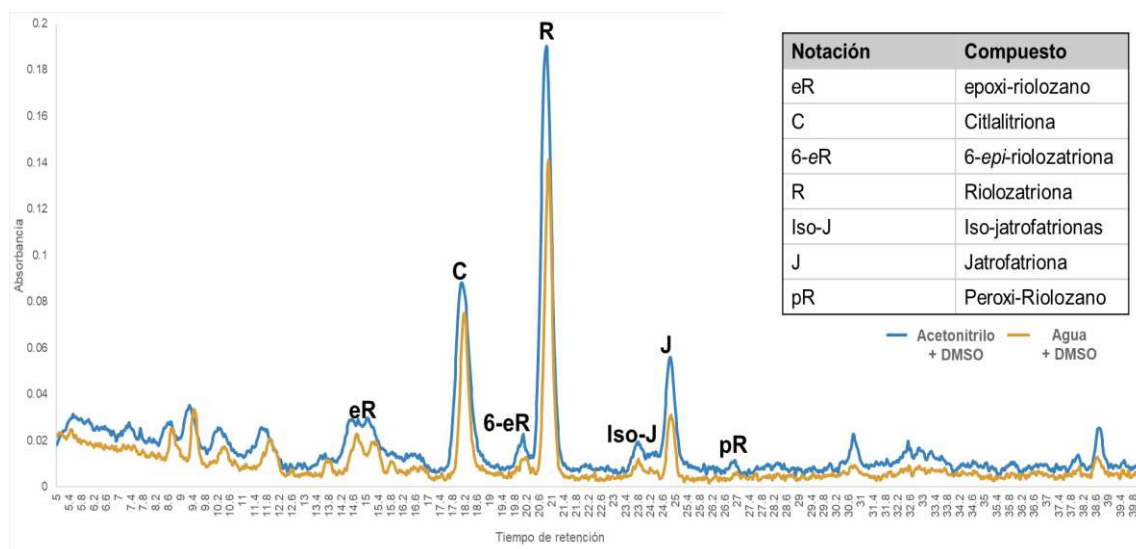
<b>Lote No.</b>	<b>Colecta</b>	<b>IS</b>
<b>1</b>	jun-13	6.5
<b>2</b>	may-14	6.8
<b>3</b>	oct-14	5.9
<b>4</b>	jun-15	4.4
<b>5</b>	sep-15	4.8
<b>6</b>	ene-16	5.0
<b>7</b>	jun-16	5.9
<b>8</b>	jul-16	3.8
<b>9</b>	jun-17	3.2
<b>10</b>	jul-17	4.7
<b>11</b>	11-jul-18	5.1
<b>12</b>	23-jul-18	4.0
<b>13</b>	mayo-18	3.7

### **3.6 Resultados de la evaluación del efecto del cambio de disolvente en la preparación de los extractos para la obtención del perfil metabolómico.**

La figura 10 muestra la comparación del cromatograma obtenido disolviendo el extracto en DMSO1%+acetonitrilo y disolviendo el extracto en DMSO1%+agua, se señalan algunos de los compuestos identificados según sus tiempos de retención; es posible observar que están presentes en ambas muestras, sin embargo, difieren en la intensidad de las señales.

En la TABLA X, se muestran las proporciones relativas del área bajo la curva de algunos de los compuestos identificados de tres colectas diferentes: octubre del 2014, junio del 2015 y julio del 2018. En las diferentes colectas

empleadas las áreas relativas calculadas son muy similares con ambos solventes; presentando una diferencia menor al 1.7%.



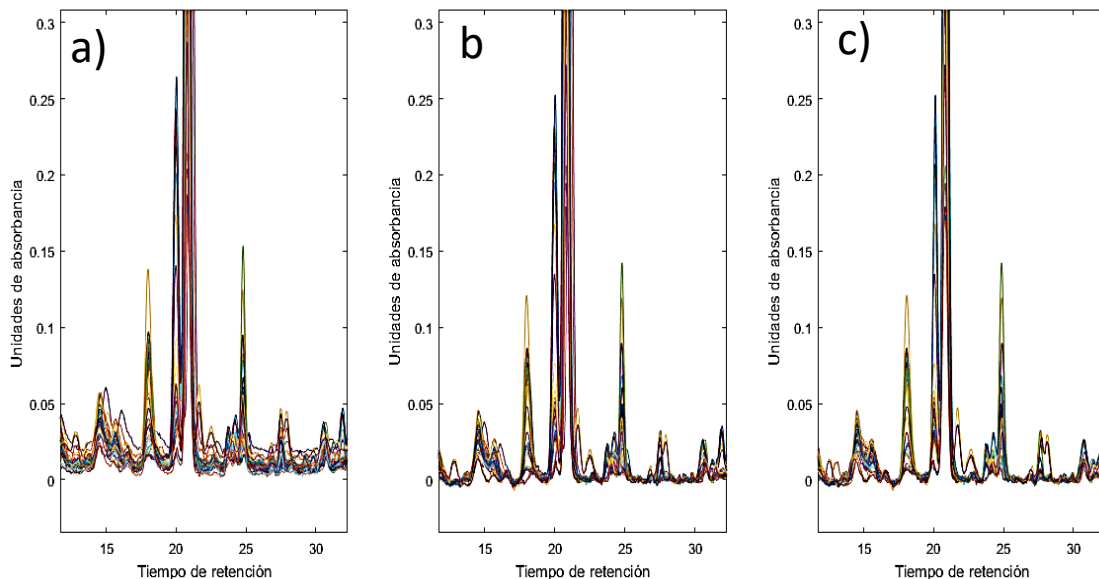
**Figura 10.** Comparación de los cromatogramas obtenidos con disolviendo el extracto en DMSO1%+acetonitrilo (línea azul) y disolviendo el extracto en DMSO1%+agua (línea naranja).

**TABLA X.** Proporciones relativas del área bajo la curva de algunos de los compuestos identificados

Compuesto	Colecta octubre 14'		Colecta junio 15'		Colecta julio 18'	
	% área ACN	% área Agua	% área ACN	% área Agua	% área ACN	% área Agua
<b>Citlaltiriona</b>	9.17	9.62	6.24	6.58	14.17	15.34
<b>6-<i>epi</i>-riolozatriona</b>	8.19	8.19	7.32	7.24	19.31	19.19
<b>Riolozatriona</b>	65.95	66.12	61.02	60.67	47.39	46.34
<b>Jatofatriona</b>	14.17	13.30	0.23	0.18	15.83	15.50
<b>Peroxi riolozano</b>	2.52	2.77	2.66	2.26	3.30	3.63

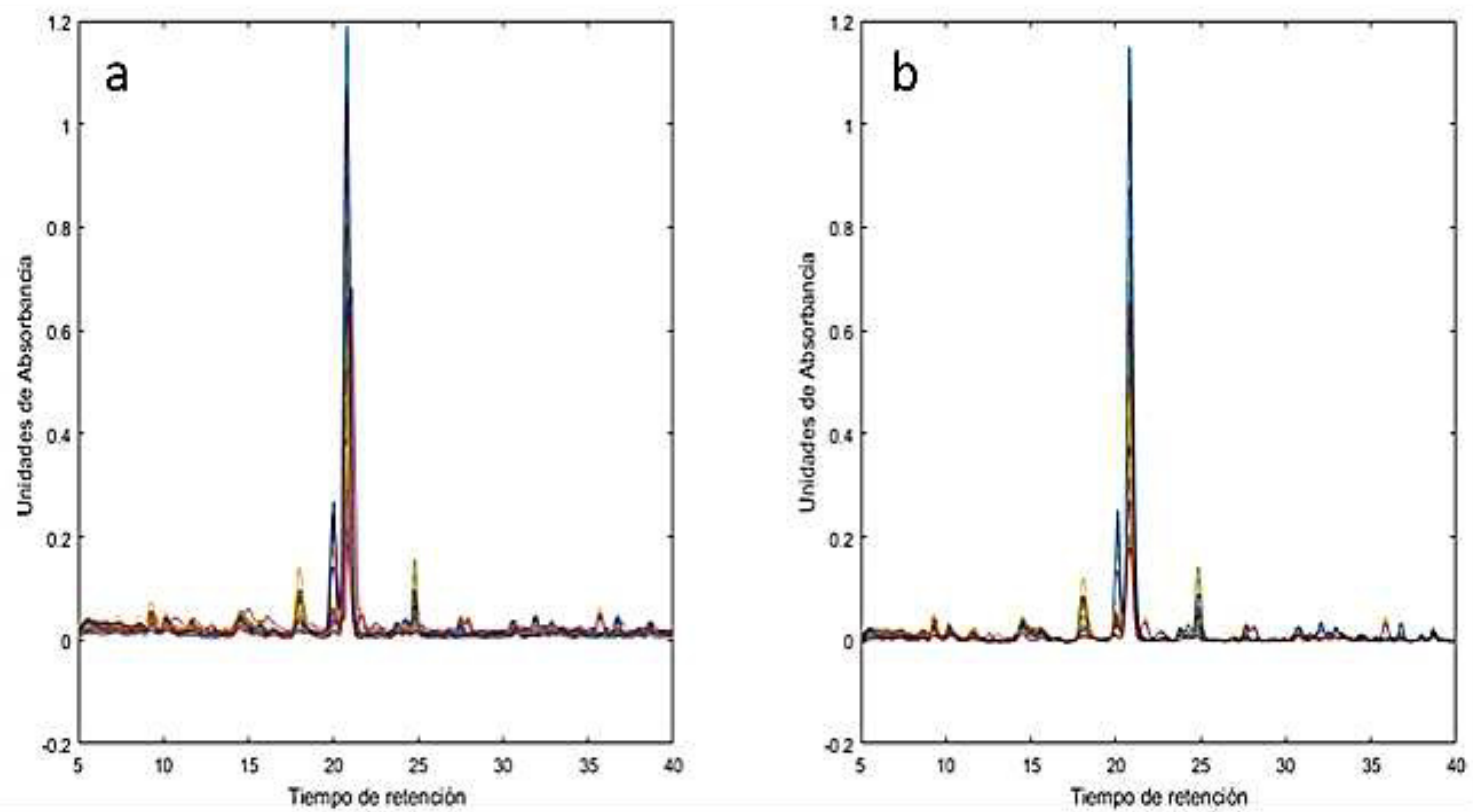
### 3.7 Resultados de la aplicación de pretratamientos

Los datos de CLAR obtenidos de los triplicados de los 13 lotes de *J. dioica* se exportaron desde el programa de control cromatográfico en formato ARW a MATLAB®. El pretratamiento de los cromatogramas se inició con el recorte de los extremos conservando del minuto 5 al 40. Fue necesario aplicar un suavizado con una ventana de filtrado de 15 (Figura 11a), una corrección de línea base (Figura 11b) y finalmente un ajuste en los tiempos de retención (Figura 11c). La figura 12 muestra la comparación de los cromatogramas iniciales y luego de los pretratamientos, es posible observar que los pretratamientos no afectaron las características de los cromatogramas, pero si corrigieron los artefactos de los mismos.



**Figura 11.** Comparación de una sección de los cromatogramas del minuto 10 al minuto 35 durante los pretratamientos: (a) suavizado, (b) corrección de línea base y (c) ajuste de los tiempos de retención.

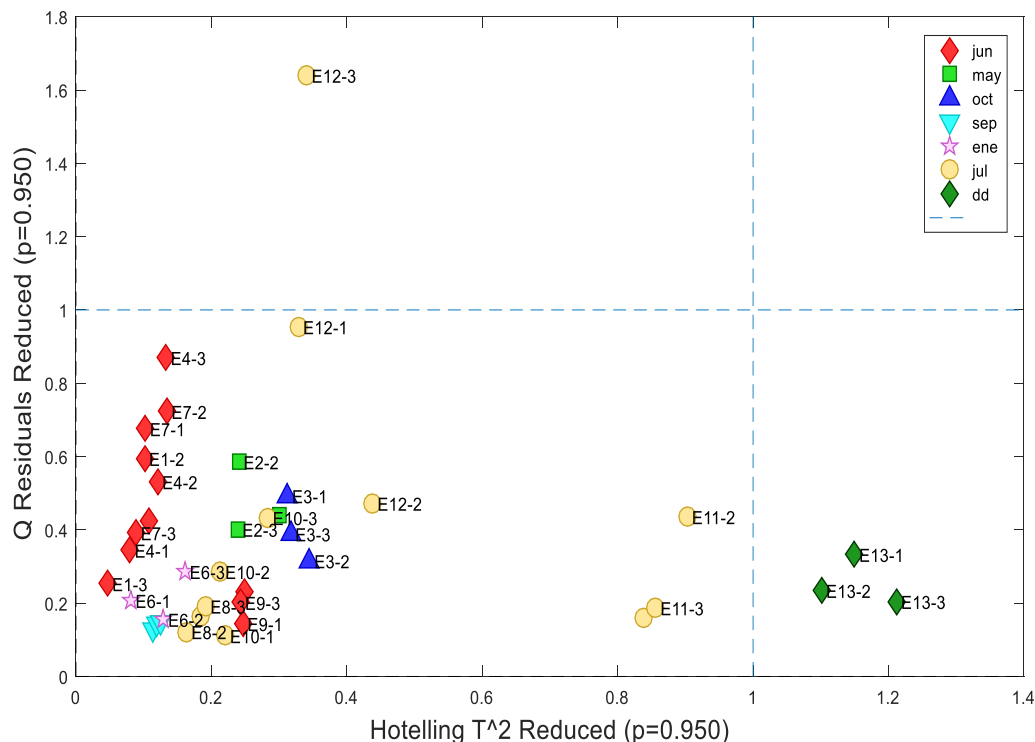




**Figura 12.** Comparación de los cromatogramas (a) antes de la aplicación de los pretratamientos, (b) después de la aplicación de los pretratamientos.

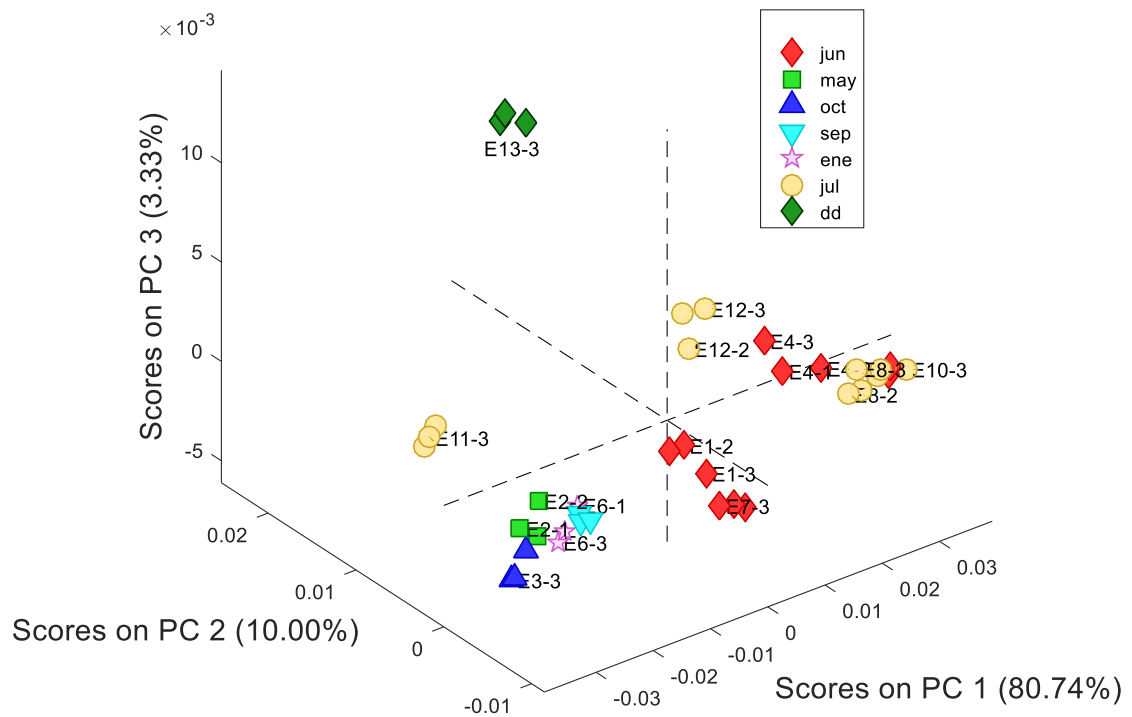
### 3.8 Análisis de componentes principales (PCA)

Se determinó que el comportamiento de las muestras podía ser descrito con tres componentes principales (PC's), obteniendo un 94% de varianza explicada con el mínimo valor de RMSECV que fue de 0.0003579. En la figura 13 se muestra un gráfico de valores de Hotelling frente a los valores residuales. En general la mayoría de las muestras se encuentran por debajo de los valores limite establecidos a un valor de  $p=0.950$  (líneas azules) y no se observa la presencia de datos anómalos. Uno de los replicados del lote 12 tiene un valor residual mayor al de las otras muestras. Además, las tres réplicas de extracción correspondientes a *J. dioica* var. *dioica* poseen un valor de Hotelling superior a todas las muestras de *J. dioica* var. *sessiliflora*.



**Figura 13.** Gráfico de los valores de Hotelling frente a los valores residuales.

En la figura 14 se representa un gráfico de los valores de scores en las primeras 3 PC's; se observa que las réplicas de extracción son muy cercanas entre sí. La PC1 separa los meses de junio y julio de los otros meses, representando época seca y húmeda respectivamente, y la PC3 separa a los extractos de *J. dioica* var. *dioica* del resto de las muestras.

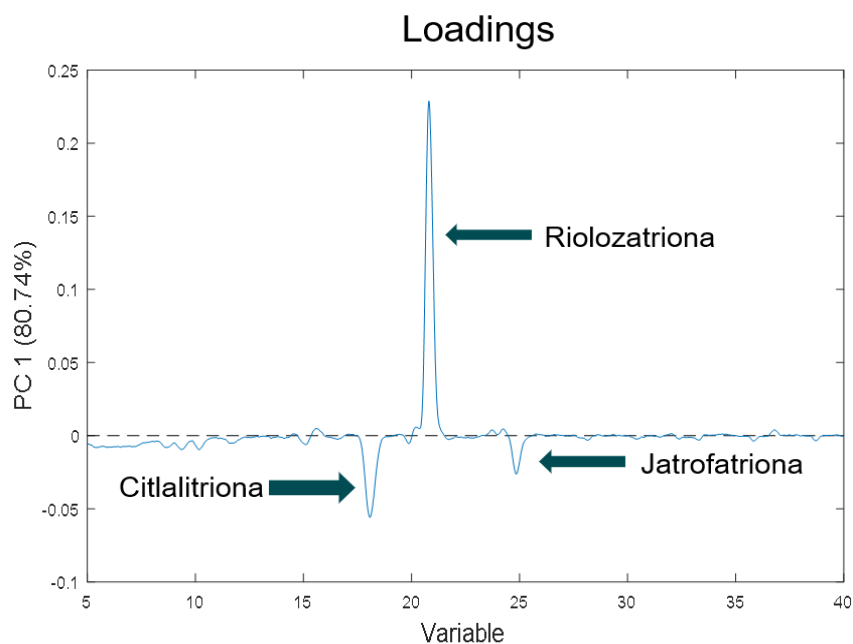


**Figura 14.** Gráfico de scores de las 3 PC'S en tres dimensiones.

Para una mejor apreciación del espacio ocupado por las muestras sobre las PC's, las figuras 15 y 16 muestran los gráficos de PC1 frente a PC2, y PC1 frente a la PC3 respectivamente.



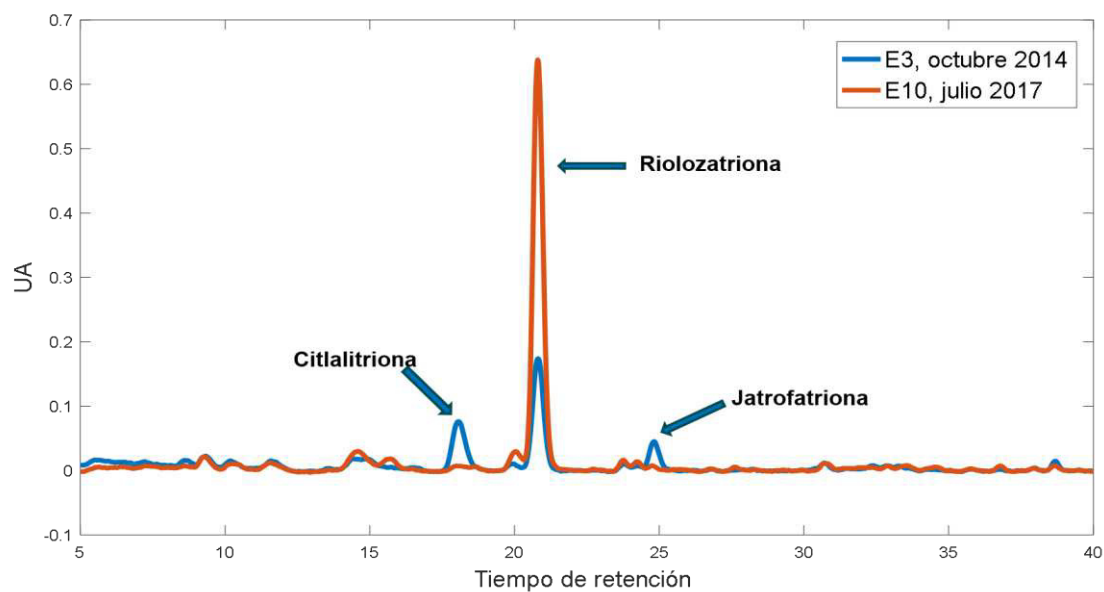
En el gráfico de los loadings de la primera componente principal (Figura 17), se observa que las variables que más contribuyen en la descripción de las muestras concuerdan con los tiempos de retención en donde aparecen la citlaltiriona, la riolozatriona y la jatrofatriona.



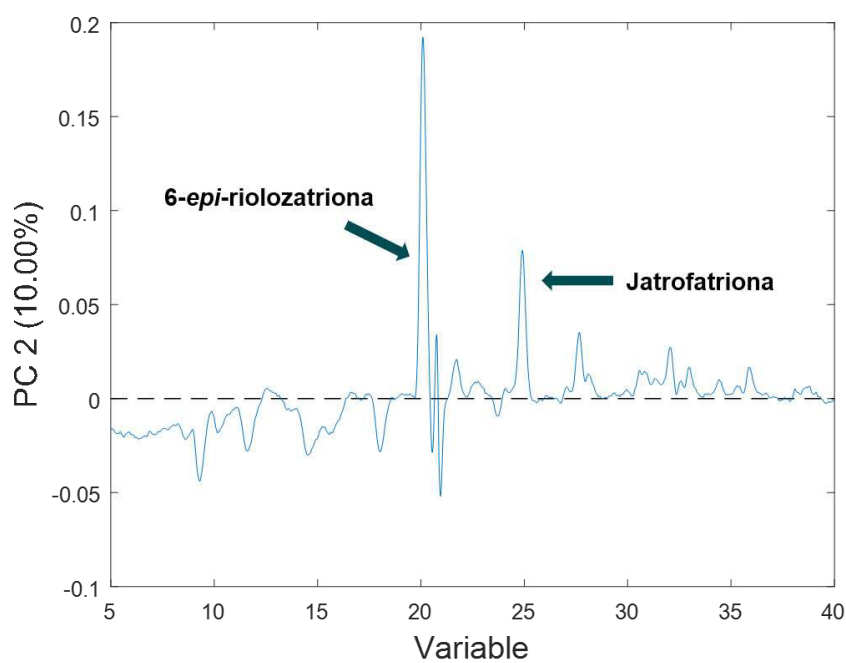
**Figura 17.** Gráfico de loadings de la primera componente principal, se indican los posibles compuestos a los que corresponden, identificados por sus tiempos de retención.

Para confirmar que existen variaciones de importancia en estas sustancias, en la figura 18 se muestra una comparación de los perfiles metabolómicos de dos colectas que se encuentran a los extremos de la primera componente principal (E3 y E10).

En el gráfico de loadings de la segunda componente principal (Figura 19) las variables que corresponden al tiempo de retención de 6-*epi*-riolozatriona se muestran como las más importantes.

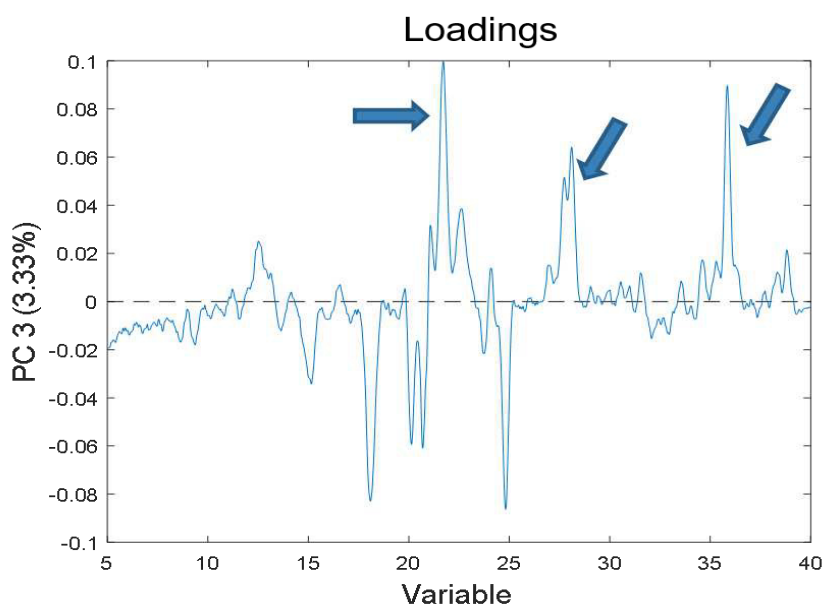


**Figura 18.** Comparación de los perfiles metabólicos de la colecta de octubre del 2014 julio del 2017



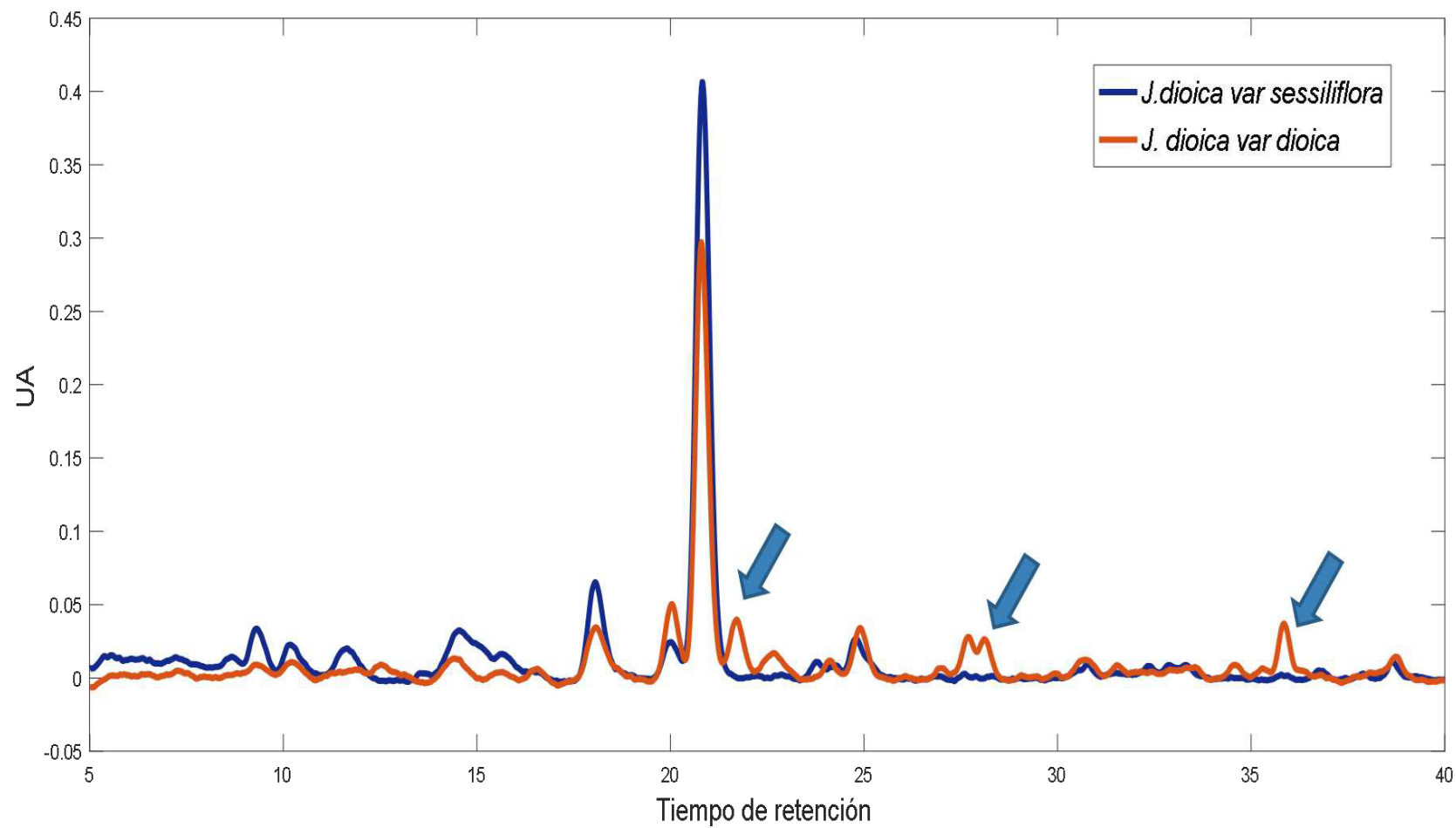
**Figura 19.** Gráfico de loadings de la segunda componente principal, se indican algunas de las contribuciones más importantes.

En el gráfico de loadings de la tercera componente principal (Figura 20) se indican 3 contribuciones importantes alrededor del minuto 21, 28 y 36. Se tomaron sólo los valores positivos, porque son estos los que describen exclusivamente a *J. dioica* var. *dioica*.



**Figura 20.** Gráfico de loadings de la tercera componente principal, se indican algunas de las contribuciones más importantes.

Para comprobar las señales correspondientes, se graficaron los perfiles metabolómicos de *J. dioica* var. *sessiliflora* y de *J. dioica* var. *dioica* en donde se presentaron diferencias importantes como se puede apreciar en la figura 21. En el perfil de *J. dioica* var. *dioica* aparecen señales cromatográficas que no se encuentran en el perfil de la variedad *sessiliflora* y que coinciden con los tiempos de retención identificados en los loadings. Esta comparación se realizó con todas las colectas de *J. dioica* var. *sessiliflora* y en ninguno de los casos se presentaron estas señales.



**Figura 21.** Cromatogramas de *J. dioica* var. *sessiliflora* y *J. dioica* var. *dioica* sobrepuestos

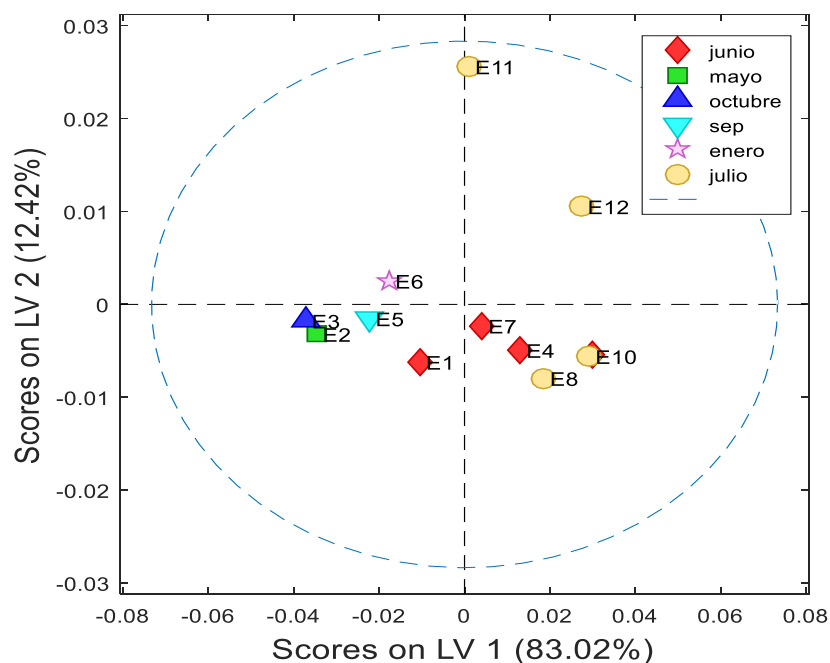


### 3.9 Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR)

#### 3.9.1 Correlación del perfil metabolómico de *J. dioica* var. *sessiliflora* con la CC<sub>50</sub>

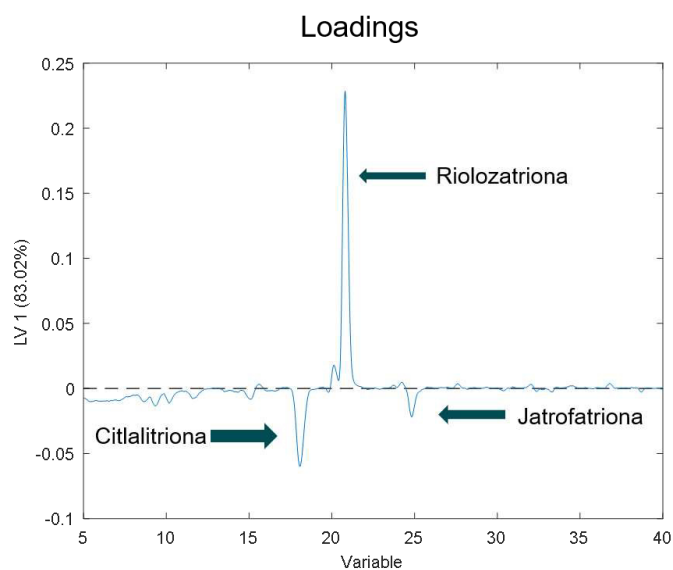
En esta correlación se determinó que dos variables latentes eran suficientes para explicar el 95.44% de la variación en “X” es decir los perfiles metabolómicos y 52.21% de la variación en “Y”, en este caso la CC<sub>50</sub>. El valor de  $r^2$  fue de 0.522.

En la figura 22 se presenta el gráfico de los valores de scores de las muestras sobre las variables latentes (VL's). Se observa que la VL1 separa las muestras en dos grupos, en el grupo de la derecha se encuentran las muestras colectadas en los meses de junio y julio y a la izquierda el resto de los meses. Por su parte, VL2 separa a las muestras E11 y E12 del resto.

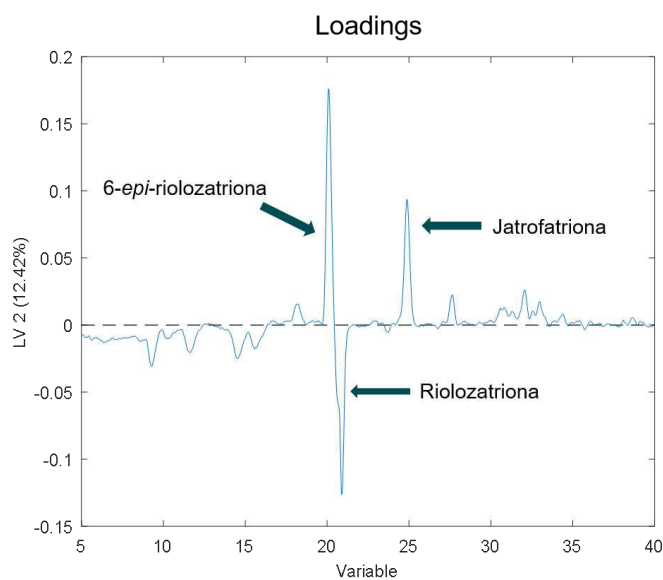


**Figura 22.** Gráfico de scores de la CC<sub>50</sub>

La figura 23 muestra que la VL1 separa las muestras según la variación de citlaltiriona, riolozatriona y jatrofatriona, mientras que la VL2 (Figura 24) indica que también la 6-*epi*-riolozatriona juega un papel importante para la explicación de la citotoxicidad.

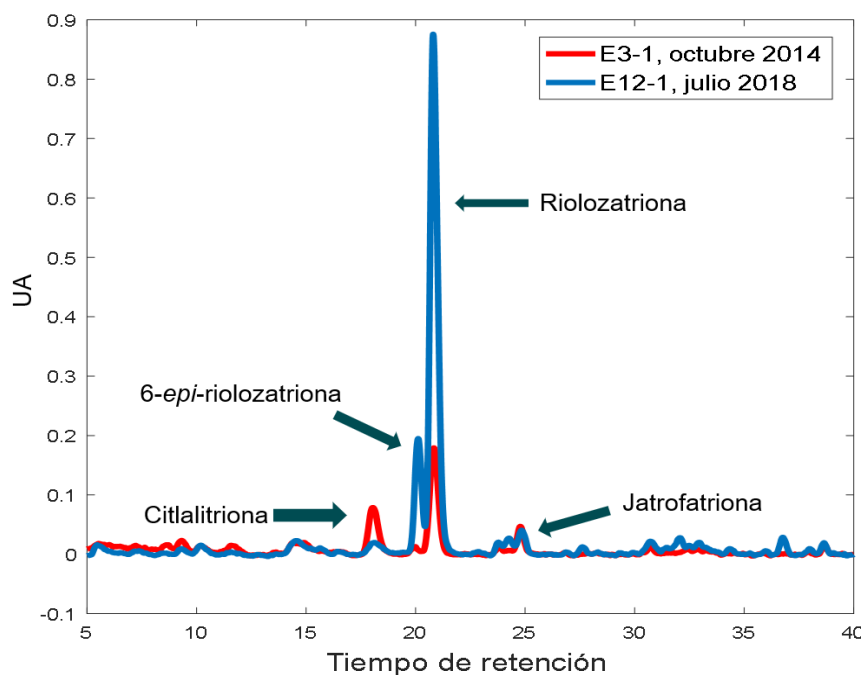


**Figura 23.** Gráfico de loadings de la VL1 de la CC<sub>50</sub>.



**Figura 24.** Gráfico de loadings de la VL2 de la CC<sub>50</sub>.

Para ver como la 6-*epi*-riolozatriona varia a cada extremo de la VL2, en la figura 25 se comparó el perfil metabolómico de 2 colectas. Como podemos observar la cantidad de 6-*epi*-riolozatriona y de riolozatriona se ven incrementadas en la colecta de julio, mientras que la citlaltiriona se ve aumentada en octubre.

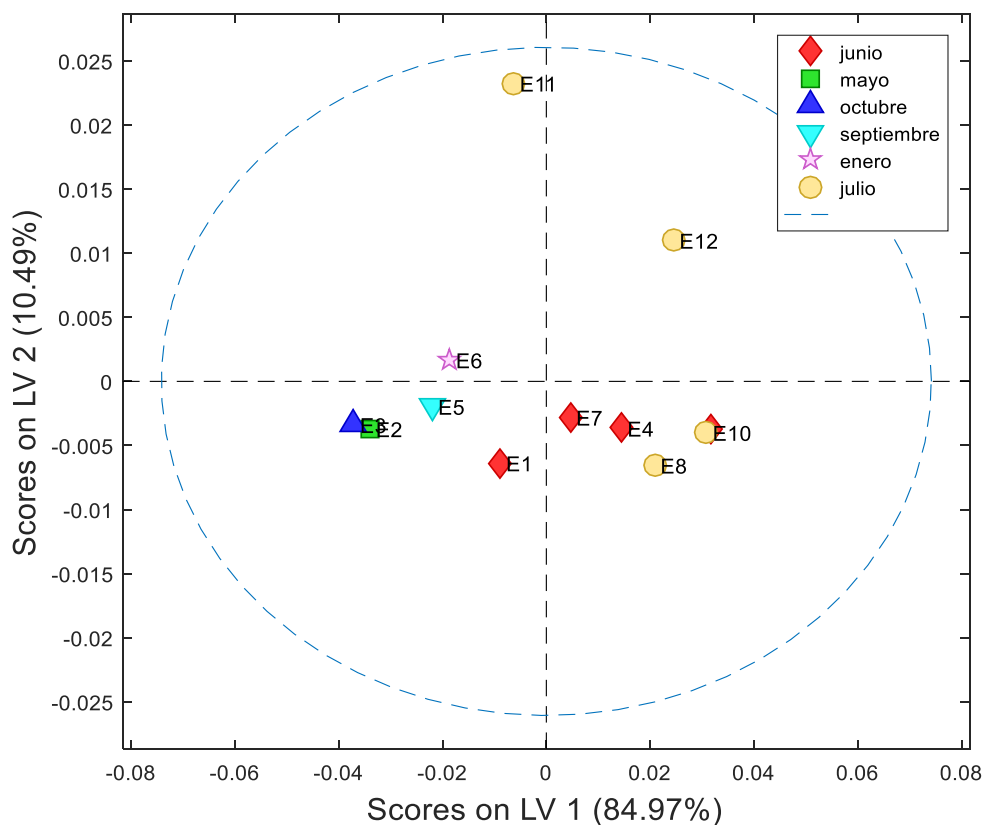


**Figura 25.** Comparación de los perfiles metabolómicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la VL2 de la CC<sub>50</sub>.

### 3.9.2 Correlación del perfil metabolómico de *J. dioica* var. *sessiliflora* con la CI<sub>50</sub>

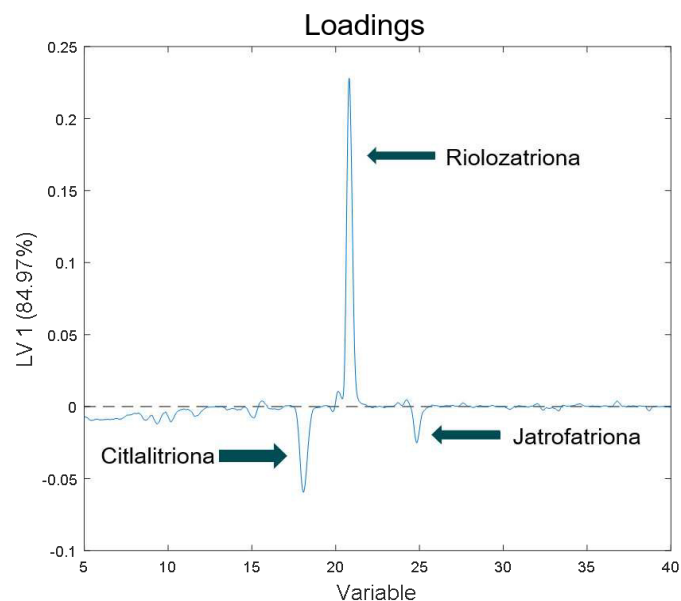
En esta correlación se determinó que dos variables latentes eran suficientes para explicar el 95.46% de la variación en “X” es decir los perfiles metabolómicos y 77.48% de la variación en “Y”, en este caso la CI<sub>50</sub>. El valor de  $r^2$  fue de 0.77.

En la figura 26 se presenta el gráfico de los valores de scores de las muestras sobre las VL's, es posible observar que la VL1 separa las muestras en dos grupos, en el grupo de la derecha se encuentran todas las muestras colectadas en los meses de junio y julio y a la izquierda el resto de los meses. Por su parte, la VL2 separa a las muestras E11 y E12 del resto.



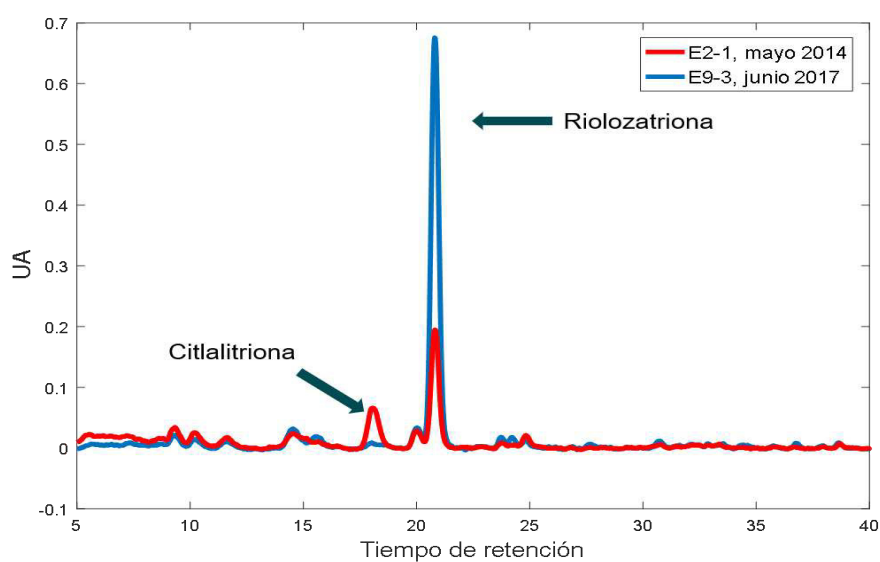
**Figura 26.** Gráfico de scores de la CI<sub>50</sub>

Al observar el gráfico de loadings (Figura 27) es posible distinguir que la VL1 separa las muestras según la variación de citlalitriona, riolozatriona y jatrofatriona, como sucedió con la actividad citotóxica.



**Figura 27.** Gráfico de loadings de la VL1 de la CI<sub>50</sub>.

Para ver como varia la proporción de estas sustancias a cada extremo de la VL1, en la figura 28 se comparó el perfil metabólico de 2 colectas. Se observa que la cantidad de citlaltiriona se ve incrementada en mayo, mientras que la producción de rioloatriona se ve aumentada en junio.



**Figura 28.** Comparación de los perfiles metabólicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la VL1 de la CI<sub>50</sub>.

### 3.9.3 Correlación del perfil metabolómico de *J. dioica* var. *sessiliflora* con la actividad anti-herpética

En esta correlación se determinó que dos variables latentes eran suficientes para explicar el 95.19% de la variación en “X” y 59.72% de la variación en “Y”, en este caso el índice de selectividad. El valor de  $r^2$  fue de 0.59.

En la figura 29 se presenta el gráfico de los valores de scores de las muestras sobre las VL's, se aprecia que la VL1 separa las muestras en dos grupos, en el grupo de la izquierda se encuentran todas las muestras colectadas en los meses de junio y julio y a la derecha el resto de los meses. Por su parte, la VL2 separa a las muestras E11 y E12 del resto.

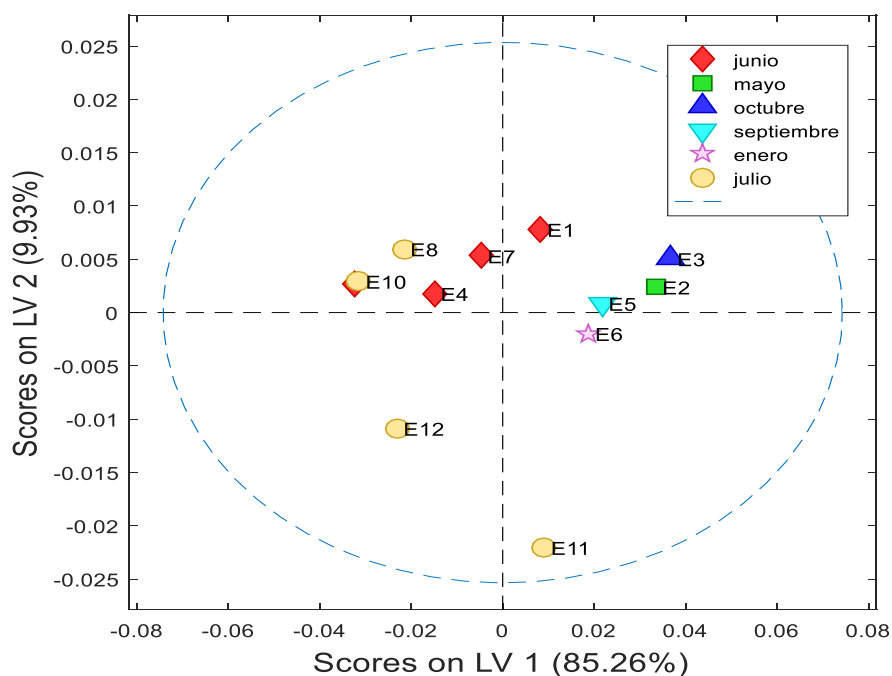
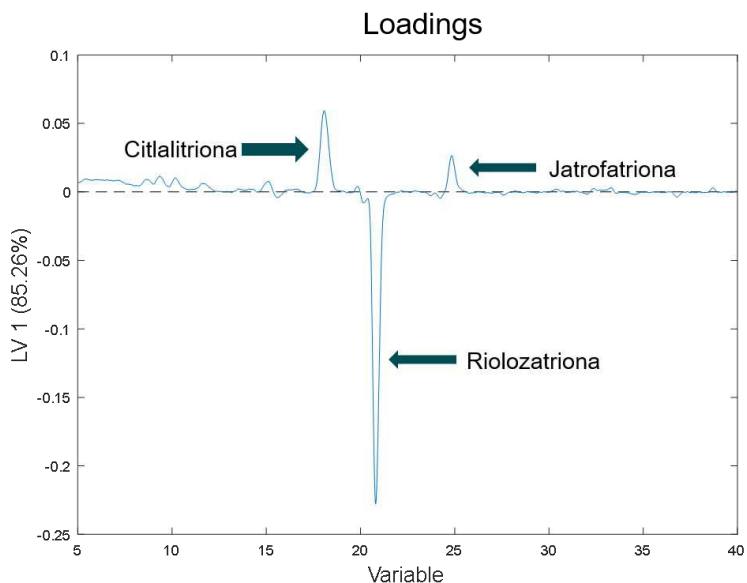
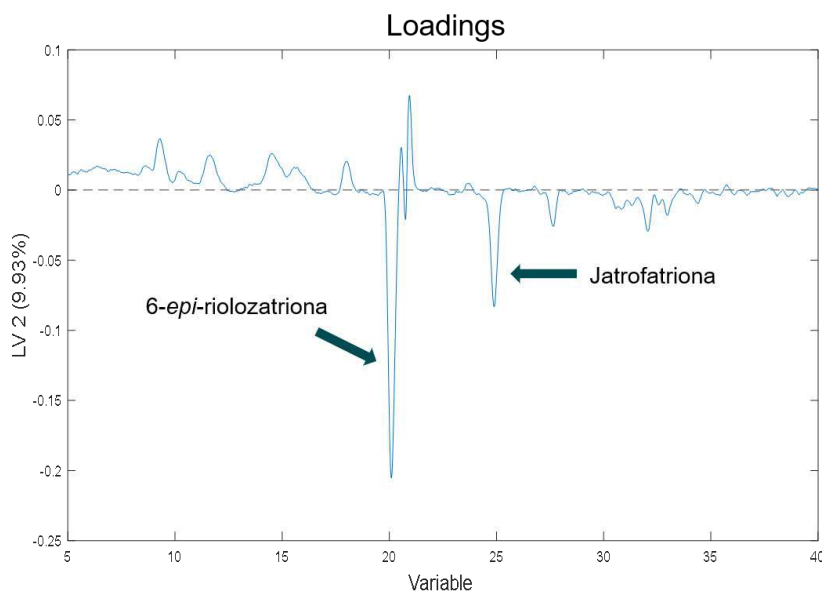


Figura 29. Gráfico de scores del IS

Al observar el gráfico de loadings (Figura 30) es posible notar que la VL1 separa las muestras nuevamente según la variación de citlalitriona, riolozatriona y jatrofatriona, mientras que la VL2 (Figura 31) indica que además la 6-*epi*-riolozatriona es importante para explicar la variación en el índice de selectividad.

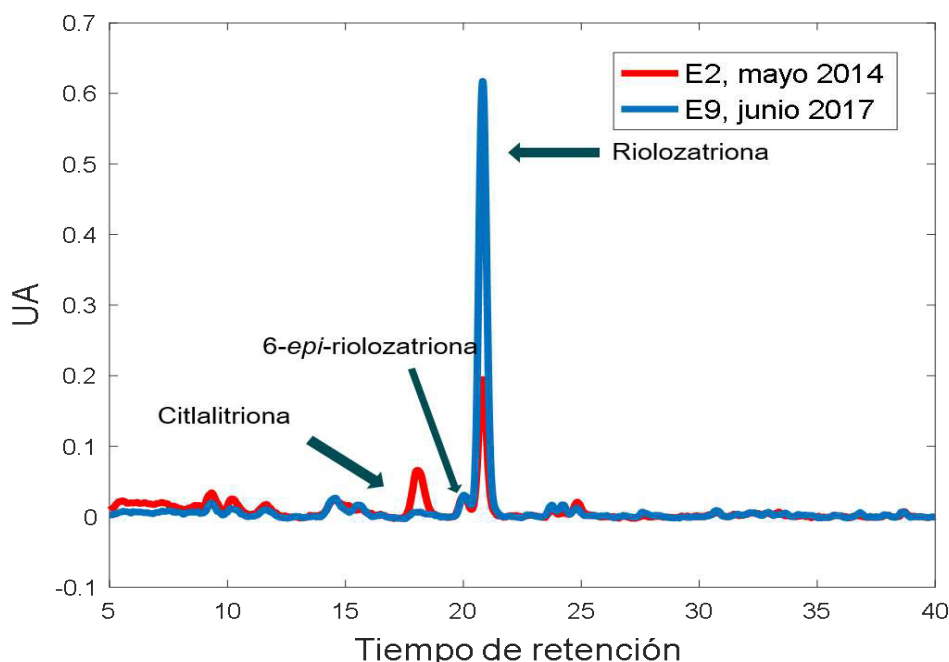


**Figura 30.** Gráfico de loadings de la VL1 del IS.



**Figura 31.** Gráfico de loadings de la VL2 del IS.

Como ejemplo de lo anterior en la figura 32 se graficó el perfil metabólico de una colecta de mayo y una colecta de junio (que se encontraban a los extremos de la VL1) donde la cantidad de 6-*epi*-riolozatriona es muy similar mientras que la cantidad de riolozatriona se ve aumentada en junio y la citlalitrona se incrementa en mayo.



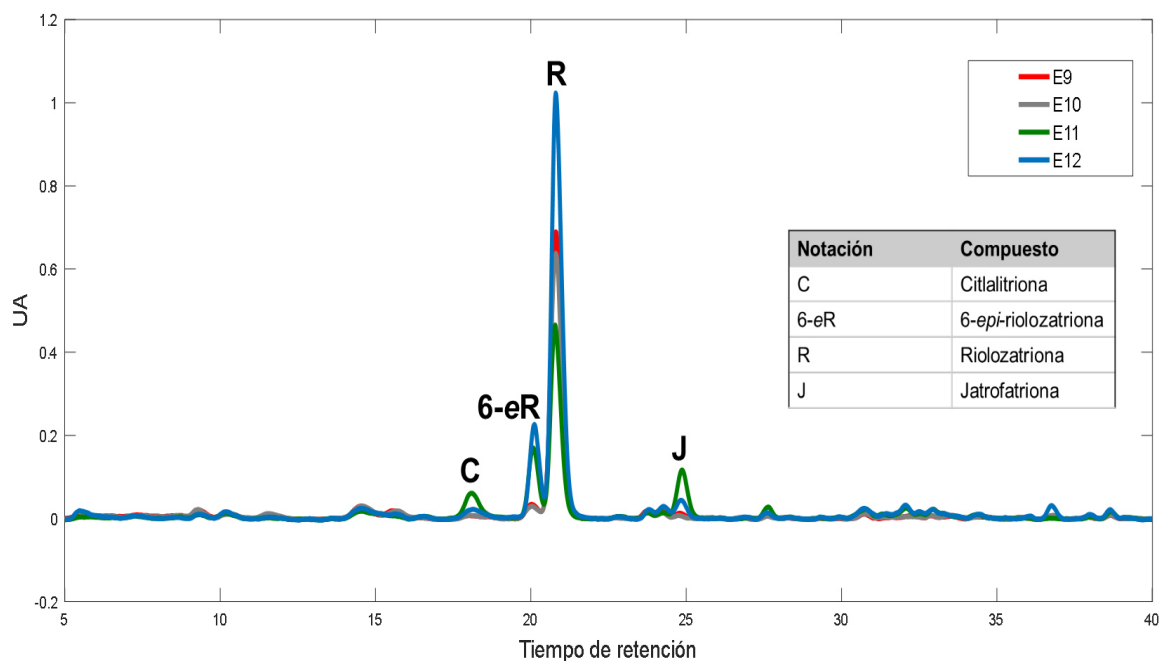
**Figura 32.** Comparación de los perfiles metabólicos de dos colectas ubicadas a los extremos de la VL1 del IS.

#### 3.9.4 Correlación del perfil metabólico de *J. dioica* var. *sessiliflora* con la actividad antimicrobiana.

En el caso de la actividad antibacteriana, fueron pocos los lotes que exhibieron actividad y en todos los casos fue de 500 µg/mL lo que imposibilitó la utilización de estos resultados para un análisis de regresión. Para ello, se realizó una comparación de los perfiles de los lotes que exhibieron actividad, con la finalidad de identificar si existe alguna tendencia o variación de los



compuestos que fuera responsable de esta. La figura 33 muestra que no se presenta una variación sistemática de los componentes que se sospecha pudieran ser responsables de la actividad.



**Figura 33.** Comparación de los perfiles metabólicos de las colectas que exhibieron actividad antibacteriana.

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

*Jatropha dioica* es un arbusto que se distribuye principalmente en el centro y norte de México [35]. Su uso en la medicina tradicional mexicana es muy diverso, desde el tratamiento de infecciones bucales y cutáneas hasta el tratamiento de la alopecia [37]. Existen reportes en donde se comprueba la actividad antibacteriana de *J. dioica* contra diversas bacterias encontradas en la cavidad bucal, también se ha evaluado su actividad antifúngica mostrando resultados positivos contra *C. albicans*. Además, el extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* posee actividad anti-herpética contra el virus del herpes simplex tipo 1 y 2 [40]–[42].

En el presente trabajo, se realizó un estudio de correlación entre el perfil metabolómico obtenido por cromatografía de líquidos de alta resolución y las actividades antibacteriana, citotóxica y anti-herpética de la raíz de *J. dioica* var. sessiliflora, mediante el empleo de métodos quimiométricos. Para ello, se seleccionó un método cromatográfico por CLAR previamente validado, en

donde fueron asignadas las señales a diversos metabolitos aislados y caracterizados presentes en la raíz de *J. dioica*.

#### **4.1 Obtención del perfil metabolómico**

Si bien el método cromatográfico estaba validado, el proceso para la obtención del extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* var. sessiliflora no estaba optimizado, lo que representaba un problema ya que se debía asegurar que al realizar la extracción de las diferentes colectas se obtuvieran al menos 30 mg de cada una de ellas. Esta era la cantidad mínima necesaria para cumplir con los diversos ensayos de actividad biológica y adquirir los cromatogramas. Por esta razón se llevó a cabo el diseño factorial completo  $2^3$  aleatorizado con 3 puntos centrales, este permite conocer el efecto que las variables tienen sobre el proceso de extracción y así elegir las condiciones que aumenten el porcentaje de rendimiento [48] .

Las tres variables que se evaluaron fueron el tiempo y velocidad de agitación y el tamaño de partícula de la raíz. Los niveles alto y bajo para las variables en el proceso de agitación se eligieron con base en la metodología establecida, en los laboratorios de extracción del departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL. El tamaño de partícula se incluyó en esta evaluación ya que se observó en extracciones previas que la modificación del tamaño de partícula provoca variación la cantidad de extracto

recuperada. Sin embargo, en ese momento no se contaba con información estadística que sustentara lo anterior.

La tabla V muestra los porcentajes de rendimiento obtenidos en cada experimento, estos se encontraron entre 1.09 a 3.03% que corresponden a 54.9 mg y 151.5 mg respectivamente. Es decir, incluso con el menor porcentaje de rendimiento obtenido la cantidad de extracto recuperada habría sido suficiente para cumplir con los objetivos.

Con los resultados de rendimiento se realizó un ajuste del modelo en el programa MODDE pro, en donde se construyó el gráfico de coeficientes que se observa en la figura 7. En este tipo de gráficos permiten observar la importancia que tienen las diferentes variables sobre la respuesta deseada, mientras más alejadas se encuentren las barras de significancia de  $Y=0$  mayor será su contribución [49]. En este caso se apreció que el tiempo y la velocidad no tuvieron una contribución importante para mejorar el rendimiento. El tamaño de partícula fue la variable que más importancia tiene para el aumento en el porcentaje de rendimiento. Se confirma lo anterior al observar la TABLA V donde los rendimientos de extracción al emplear partículas  $>1$  mm no superaron el 1.34%, mientras que el porcentaje de rendimiento mínimo al utilizar partículas  $<1$  mm fue de 2.47%. La mejora en el porcentaje de rendimiento podría deberse a que al disminuir el tamaño de partícula se aumentó el área superficial y se disminuyó la trayectoria de difusión lo que a su vez mejoró la transferencia de masa del material vegetal al solvente [50], [51].

Tomando en cuenta todo lo anterior, se decidió trabajar con el menor tiempo de agitación es decir 15 min, la velocidad de 200 rpm que es la que normalmente se utiliza en la metodología establecida y un tamaño de partícula inferior a 1 mm.

El diseño de experimentos presentó un buen ajuste, esto se puede observar en la figura 6. Todos los valores estadísticos de ajuste tuvieron un valor superior a 0.9 (se busca que sean lo más cercanos a 1) incluyendo la repetibilidad [49].

Una vez obtenidos los extractos de cada colecta con el método optimizado, se procedió a la obtención de los cromatogramas por triplicado para cada extracto. Cabe mencionar que además de los 12 lotes de raíz de *J. dioica* var. *sessiliflora* se incluyó un lote más de *J. dioica* var. *dioica*.

Los 39 cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 254 nm presentaron alrededor de 54 señales, donde gracias a sus tiempos de retención se pudieron identificar algunos de los compuestos ya conocidos por el grupo de trabajo como se observa en la figura 8.

## **4.2 Determinación de la actividad biológica de los extractos**

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana de algún extracto o compuesto generalmente se inicia con la determinación de la concentración mínima inhibitoria, con la finalidad de establecer si existe una

actividad biológica importante. Posterior a esto los extractos o compuestos que resulten con una actividad importante son sometidos a evaluación nuevamente para la determinación de su efecto bacteriostático o bactericida [52]. En general se recomienda incluir al menos una bacteria Gram positiva y una Gram negativa en la búsqueda de actividad antibacteriana [53].

Las bacterias empleadas para este propósito en el presente proyecto (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*), se seleccionaron con base a que son bacterias encontradas normalmente en la cavidad bucal, ya que uno de los usos tradicionales de *J. dioica* es como astringente para tratar aftas bucales. Además, existen reportes de actividad por parte de diferentes extractos de *J. dioica* contra las mismas.

En tabla VI se muestra que únicamente los lotes 9 al 12 presentaron actividad antibacteriana contra *E. coli* y *B. subtilis*, en todos los casos a una concentración de 500 µg/mL. Esta concentración inhibitoria contra *B. subtilis*, es similar a la ya reportada para el extracto etanólico del tallo de *J. dioica* (600 µg/mL) [39]. En el caso de *E. coli*, Silva Belmares y cols. no reportan un valor de CMI, debido a que el ensayo utilizado fue el de difusión en disco por lo que solamente se reportó un aumento del halo de inhibición respecto al control [40]. Lo mismo ocurrió con *S. aureus*, en los dos casos en donde se reporta actividad de *J. dioica* contra la bacteria no se reportó un valor de CMI [38]. Sin embargo, es de extrañarse que el extracto no presentó actividad contra *S. aureus* que es una bacteria Gram positiva, y si presentó actividad contra *B. subtilis* que es una bacteria Gram positiva esporulada o *E. coli* que es una bacteria gram negativa.

Se ha comprobado que las bacterias Gram negativas son menos sensibles a los fármacos debido a que estos deben ser de bajo peso molecular para lograr atravesar la membrana externa. Ninguno de los compuestos identificados en el extracto poseen un peso molecular tan pequeño como para atravesar la membrana, lo que indica que su actividad debió ser mediada por algún receptor [44], [53].

La determinación de la citotoxicidad se realizó con el método de Mossman en células Vero, la  $CC_{50}$  es un criterio muy importante para evaluar posteriormente la selectividad de las actividades farmacológicas probadas [53]. Además, resultó de interés conocer si el extracto de la raíz de *J. dioica* era tóxico debido que varias de las especies del género *Jatropha* han sido reportadas con toxicidad elevada [54]–[56].

En la TABLA VII, se enlistan los resultados de la  $CC_{50}$  de cada lote, la cual se encontró en valores entre 107.18 y 217.24  $\mu\text{g/mL}$ . Estos valores indicaron que el extracto no es citotóxico ya que para ser considerado como tal debe presentar una  $CC_{50}$  inferior a 100  $\mu\text{g/mL}$  [53]. Además, es posible observar que los valores de  $CC_{50}$  no siguieron un patrón específico según la época de colecta.

La actividad anti-herpética se determinó mediante la evaluación de la reducción de placas virales en células Vero. Estas células tienen la característica de crecer en monocapa, adhiriéndose a la superficie lo que facilita la observación del daño citopático causado por el virus evidenciado en forma de zonas sin crecimiento celular llamadas placas virales [53], [57]. Se

determinó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) como la concentración necesaria del extracto que provoca reducción en las placas virales en un 50 % con respecto al control. Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos para las diferentes colectas se encontraron entre 20.45 y 43.27  $\mu\text{g/mL}$ . Como se puede apreciar en la TABLA VIII, los meses más secos presentaron un incremento en la  $CI_{50}$  respecto a los meses fríos y húmedos.

Finalmente, la actividad anti-herpética se determinó con el índice de selectividad (IS). Este es un componente intrínseco de la prueba antiviral y se refiere a la relación entre la concentración máxima del fármaco que causa una inhibición del 50% del crecimiento de las células normales y la concentración mínima del compuesto/extracto en la cual se inhibe el 50% del virus. Los informes de actividad antiviral de extractos o compuestos (incluso en concentraciones muy bajas) que carecen de datos de IS, tienen un valor limitado [53]. El IS de los extractos de cloruro de metileno de la raíz de *J. dioica* var. *sessiliflora* se encontró en valores entre 3.2 y 6.8, estos valores son similares a los ya reportados para el extracto hidroalcohólico y hexánico de la raíz, así como para los componentes puros riolozatriona, 6-*epi*-riolozatriona y jatrofatriona, lo que les confiere una actividad anti-herpética moderada [42], [44].

Es importante mencionar que en este punto, surgió la incertidumbre si la preparación de los extractos para la obtención de los cromatogramas y para las evaluaciones biológicas, podían equipararse de tal manera que, en ambos casos estuvieran presentes los mismos componentes del extracto para



posteriormente realizar una correlación adecuada de actividad con el perfil metabolómico.

Para la utilización de los extractos en los diferentes bioensayos estos se disolvieron en DMSO 1% y posteriormente se añadió algún medio de cultivo; mientras que, en la preparación de los extractos para la adquisición de los cromatogramas, estos se disolvieron en DMSO 1% y posteriormente en acetonitrilo. Uno de los factores importantes en el proceso de disolución, es la elección del disolvente a utilizar ya que la polaridad de éste determina el tipo de compuestos a extraer [58]. El agua posee una polaridad mayor al acetonitrilo, por lo que era posible que los compuestos disueltos variaran según el disolvente y por lo tanto los compuestos presentes en los cromatogramas difieran de los compuestos probados en los bioensayos. Con el fin de observar que este cambio en el disolvente no ocasionaba alguna variación en el patrón de señales o en su proporción se decidió realizar una prueba cambiando el medio de cultivo por agua, siendo este su componente mayoritario [59], [60].

La figura 10 muestra la comparación de los cromatogramas con ambos métodos de disolución de los extractos, se puede observar que el patrón de señales es el mismo e incluso se identificaron algunos de los compuestos conocidos. Sin embargo, las señales difirieron un poco en su intensidad. Para comprobar que la proporción de las áreas se mantuvo constante, se obtuvo el área bajo la curva de algunos de estos compuestos y se determinó su proporción relativa.

En la TABLA X, se muestran las proporciones relativas del área bajo la curva de algunos de los compuestos identificados de tres colectas diferentes: octubre del 2014, junio del 2015 y julio del 2018. Los porcentajes de áreas fueron muy similares en todas las colectas variando en menos del 1.7%. Con estos resultados fue posible asegurar que, aunque se utilizó un disolvente diferente los compuestos que aparecieron en ambos cromatogramas fueron los mismos, y más importante que a pesar de que las concentraciones de los compuestos disminuyeron, las proporciones permanecieron constantes. Por todo lo anterior fue posible utilizar los cromatogramas adquiridos para realizar los estudios de correlación.

#### **4.3 Estudio de correlación del perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora con la actividad biológica**

El último objetivo planteado en este proyecto, fue establecer la correlación que existe entre el perfil metabolómico del extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* con su actividad biológica. La aplicación de pre-tratamientos a los cromatogramas obtenidos, fue el primer paso a seguir antes de la aplicación de los modelos matemáticos.

Como se aprecia en la figura 12a, fue evidente la presencia de ruido en los cromatogramas obtenidos, así como una diferencia en la pendiente de la línea base y ligeros desplazamientos en los tiempos de retención. Los pretratamientos se iniciaron con un recorte de los extremos dejando únicamente las señales que comprenden de 5 a 40 min, esto se realizó para eliminar el área del tiempo muerto y la sección final de 20 minutos en donde solamente

aparecía ruido. Se continuó con un suavizado, una corrección de línea base y finalmente un ajuste en los tiempos de retención.

La figura 12b muestra el resultado de la aplicación de los pre-tratamientos a cada cromatograma, es posible observar que se disminuyó en gran medida el ruido, la corrección de línea base eliminó con éxito las diferencias en la pendiente y las señales cromatográficas aparecen alineadas. Con todo lo anterior la calidad de las señales analíticas mejoró notablemente y esto no afectó la información contenida en el perfil metabolómico como se demostró posteriormente en el PCA.

Posteriormente se dio inicio a la aplicación de los modelos matemáticos con la finalidad de encontrar similitudes de los extractos analizados y evaluar la correlación entre el perfil metabolómico y las actividades biológicas.

El primer modelo matemático construido fue el análisis de componentes principales (PCA) con la finalidad de conocer el agrupamiento natural de las muestras. El primer pre-procesamiento aplicado fue la normalización área unidad, para eliminar las variaciones atribuidas a las fuentes experimentales como el ruido analítico o el sesgo experimental. Se continuó con un centrado en la media para lograr que cada muestra exhibiera solo las diferencias que tiene respecto a la muestra promedio de los datos originales [23], [24].

Los resultados indicaron que las primeras 3 componentes principales (PC's) explicaban el 94% de la varianza. La figura 13 muestra un gráfico de valores de Hotelling frente a los valores residuales, este tipo de gráficas

permiten identificar la presencia de datos anómalos [24]. Es posible observar que uno de los replicados del lote 12 tenía un valor residual mayor al de las otras muestras (casi el doble), sin embargo, al presentar un valor pequeño de Hotelling no fue necesario excluir esta muestra. Además, todas las réplicas del extracto correspondiente a *J. dioica* var. *dioica* se encontraron a valores de Hotelling ligeramente mayores al resto, esto indicó una influencia moderada de esta colecta sobre el modelo. A pesar de lo anterior no se encontró la presencia de datos atípicos los cuales presentarían valores de Hotelling y residuales elevados, por lo que se aseguró que el modelo describía las muestras.

En la figura 15 se puede observar que las muestras colectadas en junio y julio se agruparon a valores positivos de la primera componente, mientras que el resto de las colectas permanecieron a valores negativos de la misma. También es posible observar que los lotes 11 y 12 ambos colectados en julio del 2018 se encontraron a valores positivos de la PC2 a diferencia de todos los otros lotes colectados en julio. Posiblemente este comportamiento se deba a cambios en las condiciones climáticas, ya que de acuerdo a los valores históricos de temperatura y precipitaciones, se encontró que particularmente en julio de ese año se registraron 54.6 mm de precipitación mientras que el promedio histórico es de 28.3 mm de precipitación [61]. Probablemente esto generó una variación en el perfil metabolómico lo suficientemente grande para que el análisis de componentes las separara del resto.

Los gráficos de loadings permitieron conocer la contribución de las variables que fueron importantes para describir a las muestras [27]. La figura 17

presenta el gráfico de loadings de la primera componente principal, en donde se indica que fueron 3 variables las más importantes. Estas variables concuerdan con los tiempos de retención en donde aparecen citlalitrona, riolozatriona y la jatrofatriona. La agrupación de las muestras a valores negativos de la primera componente principal se debió a variaciones de citlalitrona y jatrofatriona, mientras que las agrupaciones en valores positivos se atribuyeron a riolozatriona. Es decir, fue la variación en estas tres sustancias lo que generó agrupaciones de las distintas muestras.

Con el objetivo de apreciar de mejor manera estas diferencias, se optó por comparar los perfiles metabolómicos de dos colectas. Se eligieron la colecta de octubre del 2014 y la colecta de julio del 2017 ya que estas se encontraban a los extremos de la primera componente principal 1 (PC1). Como se aprecia en la figura 18, la colecta de octubre contenía una cantidad mayor de citlalitrona y jatrofatriona respecto a la colecta de julio; mientras que riolozatriona aumentó de forma importante su producción en julio.

En la figura 19, se indica que la 6-*epi*-riolozatriona fue la variable más importante en la PC2. Es la variación en este compuesto lo que separó al lote 11 y 12 del resto como se observa en la figura 15. Como se mencionó anteriormente, el aumento en la cantidad de precipitación pluvial, aparentemente fue lo que originó esta diferencia en el contenido de 6-*epi*-riolozatriona en el perfil.

Por otra parte, como se observa en la figura 16, la PC3 separa a los extractos de *J. dioica* var. *dioica* del resto de las muestras, lo que indicó

diferencias en el perfil metabólico de ambas variedades. En el gráfico de loadings de la PC3 (Figura 20) se puede apreciar que aparecieron 3 contribuciones importantes alrededor de los minutos 21, 28 y 36. Con el fin de corroborar la contribución de las señales mencionadas, se compararon los perfiles de *J. dioica* var. *dioica* y *J. dioica* var. *sessiliflora*, como se muestra en la figura 21 aparecieron señales en el perfil de *J. dioica* var. *dioica* que no se encontraron en *J. dioica* var. *sessiliflora* y que coinciden con los tiempos de retención identificados en los loadings. Esta comparación se realizó con todas las colectas de *J. dioica* var. *sessiliflora* y en ninguno de los casos se presentaron estas señales. Lo anterior sugiere que este método podría ser capaz de diferenciar entre variedades de *J. dioica*. Sin embargo, es necesario contar con más lotes de diferentes épocas de *J. dioica* var. *dioica* para corroborar que estas nuevas señales permanecen a pesar de la estacionalidad.

Finalmente, para la búsqueda de correlaciones entre el perfil metabólico y las actividades biológicas se utilizaron modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales.

En todos los modelos de regresión elaborados, se aplicó como preprocesamiento una normalización área unidad, para eliminar las variaciones atribuidas a las fuentes experimentales como el ruido analítico o el sesgo experimental y un centrado en la media para lograr que cada muestra exhibiera solo las diferencias que tiene respecto a la muestra promedio de los datos originales. El método que se eligió para la validación cruzada en todos los

casos fue el de persianas venecianas. En los estudios de regresión únicamente se incluyeron los lotes de *J. dioica* var *sessiliflora*.

El valor de  $r^2$  para evaluar la correlación entre el perfil metabolómico y la  $CC_{50}$  fue de 0.522 lo que sugiere una correlación moderada [62]. Lo anterior confirma que los valores de toxicidad de la raíz *J. dioica* var. *sessiliflora* no varían de forma importante según época de colecta, lo que hace seguro su uso a lo largo del año.

En la figura 22 podemos ver como la VL1 separó a las muestras de junio y julio del resto de los meses. Al analizar los gráficos de los valores de loadings (Figuras 23 y 24) se observa que nuevamente fueron citlaltiriona, riolozatriona y jatrofatriona los compuestos responsables de las contribuciones en la VL1; mientras que la VL2 indica que 6-*epi*-riolozatriona tomó un papel muy importante para la separación de las muestras.

Para observar con más detalle estas diferencias se graficaron dos colectas a los extremos de la VL2. Como se aprecia en la figura 25, la cantidad de 6-*epi*-riolozatriona y riolozatriona se vieron incrementadas de forma importante en la colecta de julio respecto a la colecta de octubre. También se puede observar que el mes de octubre tenía una mayor cantidad de citlaltiriona y que respecto a riolozatriona se encontraba en una proporción 1:2, mientras que jatrofatriona se presentó en una proporción 1:3 respecto a riolozatriona.

La diferencia en la proporción de estos compuestos ocasionó una notable variación en el valor de  $CC_{50}$ . Como se muestra en la TABLA VII, la colecta de

octubre del 2014 presentó una  $CC_{50}$  de 124.12  $\mu\text{g/mL}$  mientras que el valor de  $CC_{50}$  para la colecta de julio del 2018 fue de 217.24  $\mu\text{g/mL}$ .

El segundo modelo de regresión construido se realizó con el objetivo de conocer la correlación entre el perfil metabolómico y la reducción de placas virales. El valor de  $r^2$  fue de 0.77, es decir existe una correlación elevada [62]. Hasta el momento no existen reportes de correlación entre los compuestos presentes en el perfil metabolómico y las actividades biológicas de la raíz de *J. dioica*, estos resultados podrían dar un acercamiento a los compuestos responsables de las actividades.

En la figura 26, se aprecia como la VL1 separó a las muestras de junio y julio del resto de los meses, al observar el gráfico de loadings de la figura 27 se indica que son de nueva cuenta citlaltiriona, riolozatriona y jatrofatriona los compuestos que ocasionaron la separación de los grupos a la izquierda y a la derecha de la VL1. Con el fin de conocer como varían la proporción de estos compuestos se comparan en la figura 28 dos perfiles de colectas a los extremos de la VL1. Se aprecia que en el mes de junio del 2017 la cantidad de riolozatriona aumentó de forma considerable respecto a los otros compuestos, mientras que en mayo la proporción de citlaltiriona mantuvo una relación de 1:2 con riolozatriona.

Este cambio en la proporción de los componentes en el perfil metabolómico de ambas colectas generó una variación en los valores de  $CI_{50}$ . Como se observa en la tabla VII, la colecta de mayo del 2014 presentó una  $CI_{50}$  de 20.45  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la colecta de junio del 2017 exhibió una  $CI_{50}$  de



43.27  $\mu\text{g/mL}$ . Es decir, el extracto de junio inhibió en menor medida la formación de placas virales.

Lo anterior pudiera deberse a un efecto de sinergia entre citlaltiriona y riolozatriona, ya que, según lo reportado por Melchor Martínez y cols., citlaltiriona presenta una  $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ , es decir, no es de importancia biológica; mientras que riolozatriona posee una  $\text{CI}_{50}$  de  $66 \mu\text{g/mL}$ , por lo que se esperaría que al incrementar la cantidad de riolozatriona el valor de  $\text{CI}_{50}$  disminuiría, cosa que no ocurrió. Cabe mencionar que sería necesario realizar más análisis para asegurar que existe un efecto de sinergismo.

El valor de  $r^2$  en el estudio de regresión para la búsqueda de la correlación entre perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora con su actividad anti-herpética fue de 0.59, lo que es indicativo de que existe una correlación moderada [62]. Este resultado indica que los compuestos responsables de la actividad anti-herpética varían ligeramente de forma estacional. Esto es importante ya que, sin importar la fecha de colecta el efecto anti-herpético moderado se conserva, a diferencia del efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico del rizoma de *J. dioica* var. dioica, el cual se aumenta en los meses secos [37].

La figura 29 presenta el gráfico de scores del IS, se puede observar que la VL1 nuevamente separó los meses de junio y julio del resto y, la VL2 alejó a los lotes 11 y 12 de las otras colectas de julio. En la figura 30, se observa que las variables más importantes para la VL1 como en todos los casos fueron citlaltiriona, riolozatriona y jatrofatriona.

Al comparar dos colectas que se encontraron a los extremos de la VL1 (Figura 32), se observa que en el mes de mayo la cantidad de citlaltiriona aumentó ligeramente, la cantidad de riolozatriona se incrementó en junio mientras que 6-*epi*-riolozatriona y jatrofatriona permanecieron constantes. El índice de selectividad para la colecta de mayo fue de 6.8, mientras que para junio fue de 3.2 debido a estas variaciones, lo que refuerza la teoría del efecto de sinergismo entre citlaltiriona y riolozatriona.

En el caso de la actividad antibacteriana, fueron pocos los lotes que exhibieron actividad y en todos los casos fue de 500 µg/mL, lo que imposibilitó la utilización de estos resultados para un análisis de regresión. Con la finalidad de identificar si existía un patrón en los perfiles cromatográficos de los lotes que exhibieron actividad, se realizó una comparación de éstos para ver si era posible identificar algún compuesto que fuera responsable de la actividad antibacteriana (Figura 33). Sin embargo, como se muestra en el cromatograma, no se presentó una variación sistemática de los componentes que se sospecha pudieran ser responsables de la actividad.

Hasta el momento no existen reportes de la presencia de riolozatriona en otras especies del género *Jatropha*, lo que indica que sería posible utilizarla como un biomarcador de la especie *J. dioica*. Claro es que se requiere de un estudio más amplio, en el que se analicen extractos de otras especies del género *Jatropha* centrados en la búsqueda de riolozatriona. La identificación de señales adicionales en el perfil de *J. dioica* var. *dioica* respecto al perfil de *J. dioica* var. *sessiliflora*, sugiere que es posible identificar mediante su perfil

metabolómico a *J. dioica* var. sessiliflora de otras variedades de la especie. Además, esto permitirá en un futuro emplear el método para determinar la calidad de un producto fitoterapéutico, ya que será posible identificar adulteraciones con otras especies del género *Jatropha* o con otro tipo de plantas.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- La proporción de compuestos del perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora varía ligeramente de forma estacional.
- El extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* var. sessiliflora no presenta variaciones de importancia en su actividad biológica respecto a la época de colecta.
- La actividad citotóxica (CC<sub>50</sub>) y la actividad anti-herpética (IS) presentaron correlación moderada con el perfil metabolómico de *J. dioica*.
- El extracto de diclorometano de la raíz de *J. dioica* no presentó actividad antibacteriana contra las bacterias evaluadas y por tanto no fue posible establecer una correlación.
- La disminución en el valor de CI<sub>50</sub> en el ensayo de reducción de placas virales, puede deberse a un efecto de sinergia entre la riolozatriona y la citlaltiriona.
- Existen diferencias entre el patrón de señales del perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora y *J. dioica* var. dioica.

## CAPITULO VI

### PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar un mayor número de análisis para corroborar el efecto de sinergia entre citlaltiriona y riolozatriona.
- ❖ Ampliar el estudio de comparación del perfil metabolómico de *J. dioica* var. sessiliflora colectada en otras locaciones, colectas de otras variedades de *J. dioica* y, además, de otras especies del género *Jatropha*.
- ❖ Evaluar la correlación de las actividades biológicas del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* var. sessiliflora con su perfil metabolómico por CLAR.
- ❖ Evaluar la correlación de las actividades biológicas del extracto hidroalcohólico y de diclorometano de *J. dioica* var. sessiliflora con su perfil metabolómico por RMN.

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFIA

- [1] X. Xu Wei, "Genetic diversity in the *Jatropha* genus and its potential application.," *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.*, vol. 7, no. 059, 2012.
- [2] A. C. T. A. Marinho, S. Vasconcelos, E. V. Vasconcelos, D. A. Marques, A. M. Benko-Iseppon, and A. C. Brasileiro-Vidal, "Karyotype and genome size comparative analyses among six species of the oilseed-bearing genus *Jatropha* (Euphorbiaceae)," *Genet. Mol. Biol.*, vol. 41, no. 2, pp. 442–449, 2018.
- [3] S. D. Ramalho, M. E. F. Pinto, D. Ferreira, and V. S. Bolzani, "Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family," *Planta Med.*, pp. 558–567, 2017.
- [4] J. Félix-Silva *et al.*, "Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 213, no. November 2017, pp. 12–20, 2018.
- [5] J. Fresnedo-Ramírez and Q. Orozco-Ramírez, "Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico," *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 60, no. 3, pp. 1087–1104, 2013.
- [6] N. Y. Hernández-Nicolás, L. Córdova-Téllez, A. Romero-Manzanares, J. Jiménez-Ramírez, and M. Luna-Cavazos, "Traditional uses and seed chemical composition of *Jatropha* spp. (Euphorbiaceae) in Tehuacán-Cuicatlán, México," *Rev. Biol. Trop.*, vol. 66, no. 1, p. 266, 2017.
- [7] A. Fuentes, C. García, A. Hennecke, and O. Masera, "Life cycle assessment of *Jatropha curcas* biodiesel production: a case study in Mexico," *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 20, no. 7, pp. 1721–1733, 2018.
- [8] W. Ghali, D. Vaudry, T. Jouenne, and M. Néjib, "Assessment of cyto-protective , antiproliferative and antioxidant potential of a medicinal plant *Jatropha podagrica*," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 44, pp. 111–118, 2013.
- [9] J. Félix-Silva *et al.*, "Inhibition of local effects induced by *Bothrops*

erythromelas snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*,” *Toxicon*, vol. 125, pp. 74–83, 2017.

- [10] A. B. Hernandez-hernandez, F. J. Alarcon-aguilar, J. C. Almanza-perez, and O. Nieto-yañez, “Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 204, no. 1, pp. 1–7, 2017.
- [11] M. Shoji *et al.*, “Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn . collected in Myanmar,” pp. 1–7, 2017.
- [12] C. Pereira Braga and J. Adamec, “Metabolome Analysis,” *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol.*, pp. 463–475, Jan. 2019.
- [13] J. Jacyna, M. Kordalewska, and M. J. Markuszewski, “Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Nov. 2018.
- [14] D. G. Cox, J. Oh, A. Keasling, K. L. Colson, and M. T. Hamann, “The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 12, pp. 3460–3474, 2014.
- [15] K. Peters *et al.*, “Current challenges in plant Eco-Metabolomics,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 5, pp. 1–38, 2018.
- [16] B. Cai, S. P. Ong, and X. Liu, *High Performance Liquid Chromatography Fingerprinting Technology of the Commonly-Used Traditional Chinese Medicine Herbs*. Co-published with Chemical Industry Press, 2012.
- [17] Food and Drug Administration, “Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation,” *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv.*, no. May, pp. 4–10, 2001.
- [18] WHO, “WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines,” 2007.
- [19] L. Mattoli *et al.*, “New frontiers in pharmaceutical analysis: A metabolomic approach to check batch compliance of complex products based on natural substances,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 126, pp. 156–162, 2016.
- [20] L. Giri, H. C. Andola, V. Kant Purohit, M. Rawat, R. Rawal, and I. Bhatt, “Chromatographic and Spectral Fingerprinting Standardization of Traditional Medicines: An Overview as Modern Tools,” *Res. J. Phytochem.*, vol. 4, pp. 234–241, 2010.
- [21] Y. C. Liu, L. Lin, P. Cheng, Z. L. Sun, Y. Wu, and Z. Y. Liu, “Fingerprint analysis of *Gelsemium elegans* by HPLC followed by the targeted identification of chemical constituents using HPLC coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry,” *Fitoterapia*, vol. 121, no.

April, pp. 94–105, 2017.

- [22] Z. Jiang *et al.*, “Quantification and efficient discovery of quality control markers for *Emilia prenanthoidea* DC. by Fingerprint-Efficacy Relationship Modelling,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 156, pp. 36–44, 2018.
- [23] A. Bansal, V. Chhabra, R. K. Rawal, and S. Sharma, “Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 4, no. 4, pp. 223–233, 2014.
- [24] J. R. Lucio-Gutiérrez, “Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales,” Universidad Autónoma de Barcelona, 2012.
- [25] L. Yi *et al.*, “Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 914, pp. 17–34, 2016.
- [26] J. Gerretzen *et al.*, “Simple and Effective Way for Data Preprocessing Selection Based on Design of Experiments,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 24, pp. 12096–12103, 2015.
- [27] C. Monfort, “Validación y transferencia de métodos analíticos mediante espectroscopia NIR Construcción y validación de modelos quimiométricos para la identificación y cuantificación de productos farmacéuticos,” Universidad Autónoma de Barcelona, 2014.
- [28] B. M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig, and R. S. Koch, *Chemometrics Tutorial for PLS \_ Toolbox and Solo*. 2006.
- [29] R. Kumar and V. Sharma, “Chemometrics in forensic science,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 105, pp. 191–201, 2018.
- [30] N. Pardo-Mates *et al.*, “Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods,” *Food Chem.*, vol. 221, pp. 29–38, 2017.
- [31] A. Sabir, M. Rafi, and L. K. Darusman, “Discrimination of red and white rice bran from Indonesia using HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics,” *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1717–1722, 2017.
- [32] Z. Ben Ahmed *et al.*, “Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers,” *Microchem. J.*, vol. 128, pp. 208–217, 2016.
- [33] C. Angelini, “Regression Analysis,” *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Academic Press, pp. 722–730, 01-Jan-2019.
- [34] D. I. Araujo-Espino, A. L. Zamora-Perez, G. M. Zúñiga-González, R. Gutiérrez-Hernández, G. Morales-Velazquez, and B. P. Lazalde-Ramos, “Genotoxic and cytotoxic evaluation of *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. by



- the micronucleus test in mouse peripheral blood," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 86, pp. 260–264, 2017.
- [35] J. Fresnedo-Ramírez and Q. Orozco-Ramírez, "Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico," *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 60, no. 3, pp. 1087–1104, 2013.
  - [36] "Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana." [Online]. Available: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483>. [Accessed: 14-Nov-2018].
  - [37] J. Gutiérrez-Tlahque, C. L. Aguirre-Mancilla, J. C. Raya-Pérez, J. G. Ramírez-Pimentel, R. Jiménez-Alvarado, and A. D. Hernández-Fuentes, "Effect of climate conditions on total phenolic content and antioxidant activity of *Jatropha dioica* Cerv. var. *dioica*," *Cienc. e Investig. Agrar.*, vol. 45, no. 1, pp. 70–81, 2018.
  - [38] X. A. Dominguez, G. Cano, R. Franco, A. M. Villarreal, W. H. Watson, and V. Zabel, "Rioloatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *Sessiliflora*," *Phytochemistry*, vol. 19, no. 11, p. 2478, 1980.
  - [39] M.-V. Villarreal-Treviño, Carranza-Torres, Mata-Cárdenas, "Análisis de susceptibilidad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos aislados de pacientes con periodontitis, al extracto etanólico del tallo de *Jatropha dioica*," *Rev. salud publica y bucal*, vol. Edición Es, pp. 4–6, 2006.
  - [40] Y. Silva-Belmares, C. Rivas-Morales, E. Viveros-Valdez, M. G. de la Cruz-Galicia, and P. Carranza-Rosales, "Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots.," *Pakistan J. Biol. Sci. PJBS*, vol. 17, no. 5, pp. 748–50, May 2014.
  - [41] B. A. Alanís-Garza, G. M. González-González, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres, and V. M. Rivas-Galindo, "Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 114, no. 3, pp. 468–471, 2007.
  - [42] V. Silva-Mares, David, Torres-López, Ernesto, Rivas-Estilla, Ana Maria, Cordero-Pérez, Paula, Waksman-Minsky, Noemí, Rivas-Galindo, "Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity," *Nat. Prod. Commun.*, no. November 2012, 2013.
  - [43] A. M. Villarreal, X. A. Dominguez, H. J. Williams, A. I. Scott, and J. Reibenspies, "Citlaltione, a new diterpene from *Jatropha dioica* var. *Sessiliflora*," *J. Nat. Prod.*, vol. 51, no. 4, pp. 749–753, 1988.
  - [44] E. M. Melchor-Martínez *et al.*, "Stereochemistry of a Second Riolozone and Other Diterpenoids from *Jatropha dioica*," *J. Nat. Prod.*, vol. 80, no. 8, pp. 2252–2262, 2017.
  - [45] E. M. Melchor-Martínez, "Estudio de la Biogénesis terminal de la

Rioloatriona por métodos computacionales,” Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017.

- [46] J. Támez Fernández, “Nuevos compuestos aislados de *Jatropha dioica*,” in *3va Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales*, 2017.
- [47] H. Loa Martínez, “Detección, purificación y análisis de nuevos diterpenos de *Jatropha dioica*,” Universidad Autónoma de Nuevo León, 2018.
- [48] S. T. Narendran, S. N. Meyyanathan, and V. V. S. R. Karri, “Experimental design in pesticide extraction methods: A review,” *Food Chem.*, vol. 289, pp. 384–395, Aug. 2019.
- [49] Sartorius Stedim Data Analytics AB, “Modde Lear.” 2018.
- [50] S. A. Mankanjuola, “Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 5, no. 6, pp. 1179–1185, 2017.
- [51] H. Jahongir, Z. Miansong, I. Amankeldi, Z. Yu, and L. Changheng, “The influence of particle size on supercritical extraction of dog rose (*Rosa canina*) seed oil,” *J. King Saud Univ. - Eng. Sci.*, vol. 31, no. 2, pp. 140–143, Apr. 2019.
- [52] L. S. Ramírez and D. Marín Castaño, “METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL,” *Sci. Tech.*, no. 42, pp. 263–268, 2009.
- [53] P. Cos, A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, and L. Maes, “Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept,’” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 106, no. 3, pp. 290–302, 2006.
- [54] R. C. Albino *et al.*, “Traditional detoxification of *Jatropha curcas* L. seeds,” *J. Ethnopharmacol.*, p. 111970, May 2019.
- [55] Q. Wu, J. Patocka, E. Nepovimova, and K. Kuca, “*Jatropha gossypifolia* L. and its biologically active metabolites: A mini review,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 234, pp. 197–203, Apr. 2019.
- [56] J.-S. Zhang, Y. Zhang, S. Li, A. Ahmed, G.-H. Tang, and S. Yin, “Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*,” *Bioorg. Chem.*, vol. 80, pp. 511–518, Oct. 2018.
- [57] Y. Jiang, J. E. van der Welle, O. Rubingh, G. van Eikenhorst, W. A. M. Bakker, and Y. E. Thomassen, “Kinetic model for adherent Vero cell growth and poliovirus production in batch bioreactors,” *Process Biochem.*, vol. 81, pp. 156–164, Jun. 2019.
- [58] S. Visht and S. Chaturvedi, “Review Article Isolation of Natural Products,” *Curr. Pharma Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 584–599, 2012.

- [59] “12491 - Advanced DMEM - MX.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.1.html>. [Accessed: 06-Jun-2019].
- [60] “BBL Mueller Hinton Broth,” 2012. [Online]. Available: [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds). [Accessed: 06-Jun-2019].
- [61] INEGI, “Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia,” 2019. [Online]. Available: <https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>. [Accessed: 06-Jun-2019].
- [62] D. Rowntree, *Statistics without tears : a primer for non-mathematicians*. Pearson/A & B, 2013.